

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON NEUEN
MUTATIONEN DES SPANNUNGSAKTIVIERTEN Ca^{2+} -
KANALS CACNA1H BEI DER ENTSTEHUNG DES
PRIMÄREN HYPERALDOSTERONISMUS**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER MEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Michaela Schläger

aus
Ingolstadt

im Jahr
2024

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

01.08.2024

Die Arbeit wurde angeleitet von:
PD Dr. rer. nat. Sascha Bandulik

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON NEUEN
MUTATIONEN DES SPANNUNGSAKTIVIERTEN Ca^{2+} -
KANALS CACNA1H BEI DER ENTSTEHUNG DES
PRIMÄREN HYPERALDOSTERONISMUS**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER MEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Michaela Schläger

aus
Ingolstadt

im Jahr
2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	4
1.1 Hypertonie und Primärer Hyperaldosteronismus.....	4
1.2 Das Hormon Aldosteron	5
1.3 Wirkmechanismus von Angiotensin II.....	7
1.4 Der Cav-Kanal CACNA1H: Aufbau und Funktion.....	10
1.4.1 Aufbau	10
1.4.2 Funktion	13
1.5 Mutationen des CACNA1H.....	15
1.5.1 Beschriebene Mutationen des CACNA1H	16
1.6 In dieser Doktorarbeit untersuchte Varianten: S475T und R788C	18
1.6.1 Die Variante S475T	18
1.6.2 Die Variante R788C	19
2. Zielsetzung.....	21
3. Material und Methoden.....	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Geräte.....	22
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3 Programme	23
3.1.4 Chemikalien	23
3.1.5 Lösungen und Puffer	24
3.1.6 Oligonukleotide	26
3.1.7 Plasmide.....	26
3.1.8 Verwendete Zellen.....	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Aussäen von NCI-H295R-Zellen und Vorbereiten für die Transfektion .	27
3.2.2 Transiente Transfektion-Elektroporation	27

3.2.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen.....	28
3.2.4 Stimulation mit Angiotensin II während Patch Clamp.....	30
3.2.5 RNA-Isolation.....	30
3.2.6 Realtime-PCR.....	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Expression des Gens CYP11B2 in adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid und Mutation(en) tragenden Plasmiden	32
4.2 Whole-Cell Patch Clamp Messungen an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden	34
4.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und Mutation(en)-tragendem CACNA1H.....	34
4.2.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung.....	39
4.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen unter Stimulation mit Angiotensin II an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden	44
4.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und dMUT CACNA1H ^{S475T/R788C} unter Stimulation mit Ang II.....	44
4.3.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung unter Stimulation mit Ang II	49
5. Diskussion	52
5.1 Expression des Gens CYP11B2 in adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid und Mutation(en) tragenden Plasmiden	53
5.2 Whole-Cell Patch Clamp Messungen an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden	55
5.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und Mutation(en)-tragendem CACNA1H.....	55
5.2.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung.....	57
5.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen unter Stimulation mit Angiotensin II an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden	59
5.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und CACNA1H ^{S475T/R788C} unter Stimulation mit Ang II	59

5.3.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung unter Stimulation mit Ang II	61
5.4 Oszillationen	61
5.5 Einschätzung bezüglich der Krankheitsrelevanz der untersuchten Mutationen	62
6. Zusammenfassung	64
Abbildungsverzeichnis	65
Literaturverzeichnis.....	67

1. Einleitung

Zu Beginn wird hier der theoretische Hintergrund, auf welchem die vorliegende Arbeit basiert, dargestellt. Dieser ist insbesondere wichtig, um die Fragestellung und die darauffolgenden Experimente sowie deren Ergebnisse zu verstehen und interpretieren zu können.

1.1 Hypertonie und Primärer Hyperaldosteronismus

Gemäß dem Robert Koch Institut führt ein erhöhter Blutdruck (Hypertonie) jährlich zu knapp 10 Millionen Todesfällen weltweit (Robert Koch Institut).

Das liegt daran, dass Hypertonie das Risiko für potenziell tödliche kardiovaskuläre Ereignisse, wie beispielsweise Schlaganfall (Apoplex) oder Herzinfarkt (Myokardinfarkt), erhöht.

Weltweit sind laut einem Bericht der *European Society of Cardiology (ESC)* mehr als 1 Milliarde Menschen von Hypertonie betroffen. Bei Personen über 60 Jahren leiden über 60% an Bluthochdruck (Williams et al. 2018).

Das liegt daran, dass einer der Risikofaktoren für die Entwicklung einer Hypertonie das Alter ist. Zusätzlich erhöhen aber auch ein sessiler Lebensstil, ungesunde Ernährung und wenig Bewegung das Risiko eine Hypertonie zu entwickeln (Williams et al. 2018). Damit wäre Hypertonie der wichtigste Risikofaktor für Herz – Kreislauf – Erkrankungen, der beeinflusst werden kann. Allein durch eine Veränderung des Lebensstils, könnten folglich viele Todesfälle verhindert werden.

Hinzukommend gibt es auch Erkrankungen, die sekundär zu einem erhöhten Blutdruck führen. Bei diesen Erkrankungen kann der Blutdruck durch eine Lebensstilveränderung nicht oder nur geringgradig beeinflusst werden. Diese Form der Hypertonie, welcher eine andere ursächliche Erkrankung zugrunde liegt, nennt man Sekundäre Hypertonie.

Im Gegensatz zur vorher beschriebenen Primären Hypertonie (essenzielle Hypertonie) kommt die Sekundäre Hypertonie seltener vor. Aufgrund variierender Zahlen wird spekuliert, dass 90% aller Hypertonien zu den Primären Hypertonien und circa 10% zu den sekundären Hypertonien zählen (Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL).

Sekundäre Hypertonien sind also selten, dafür können sie, sofern diagnostiziert, oftmals besser behandelt oder sogar geheilt werden. Für eine sekundäre Hypertonie kann es verschiedene organische Ursachen geben, eine davon ist der sogenannte Primäre Hyperaldosteronismus (PHA).

Laut einem Artikel in der Fachzeitschrift „*Der Internist*“ aus dem Jahr 2006 sollen 5%-10% aller Hypertoniker in Deutschland unter einem PHA leiden. Das wären bis zu 2,5 Millionen Bürger, gemessen an ca. 25 Millionen Deutschen mit Bluthochdruck (Quinkler und Reincke 2006).

Primärer Hyperaldosteronismus bedeutet, dass das Hormon Aldosteron vermehrt von der Nebenniere produziert wird, unabhängig von den physiologischen Stimuli der Aldosteronproduktion (Angiotensin II (Ang II) und K^+ , siehe **Abbildung 4**). Für einen PHA gibt es selbst auch wieder mehrere Ursachen. Die häufigste Ursache bildet mit 60-80% eine bilaterale idiopathische Hyperplasie der Nebennieren. Ein Adenom findet sich bei 20-30% der PHA – Patienten (Quinkler und Reincke 2006).

Wie das Hormon Aldosteron den Blutdruck beeinflusst und wieso eine erhöhte Aldosteron-Ausschüttung bei PHA so zu einer Hypertonie führen kann, soll im nächsten Unterpunkt verdeutlicht werden.

1.2 Das Hormon Aldosteron

Aldosteron ist ein Steroidhormon, welches folglich ein Cholesteringrundgerüst besitzt. Es zählt zu den Mineralokortikoiden, siehe **Abbildung 1**. Aldosteron wird in den Zona Glomerulosa Zellen der Nebenniere hergestellt, siehe **Abbildung 2**.

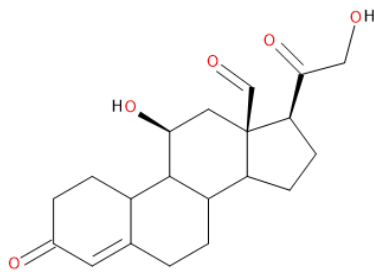


Abbildung 1 Darstellung des Hormons Aldosteron. Die vier Ringe bilden das sogenannte Steroid – Grundgerüst, welches auch Cholesterin aufweist und Aldosteron die Zuordnung zu Steroidhormonen erlaubt. Im Körper wird Cholesterin enzymatisch über mehrere Schritte zu Aldosteron umgewandelt. Dies geschieht in Zellen der Nebennierenrinde, den sogenannten Zona Glomerulosa Zellen, siehe **Abbildung 2**.

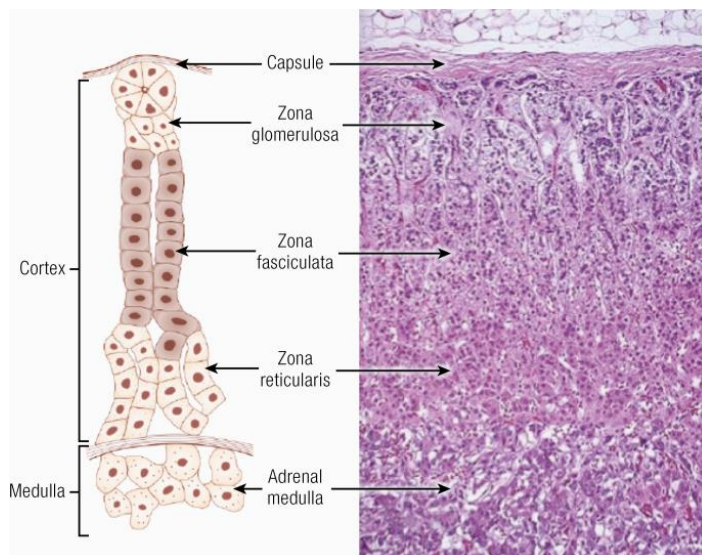


Abbildung 2 Darstellung der Nebennierenrinde mit Anschnitt des Marks. Von außen nach innen unterteilt sich die Nebennierenrinde in die Zona Glomerulosa (ZG), Zona Fasciculata (ZF) und die Zona Reticulosa (ZR). Im Inneren liegt das Nebennierenmark. In der ZG findet die Produktion des Mineralokortikoids Aldosteron statt. (Quelle: (Sherlock et al. 2020))

Aldosteron ist ein wichtiges Hormon zur Regulation des Blutdrucks. Als Mitspieler im RAAS (Renin – Angiotensin – Aldosteron – System), siehe **Abbildung 3** wirkt es auf die Niere im Sinne einer vermehrten Wasser– und Salzretention. Dies führt folglich zu einem Anstieg des Blutdrucks.

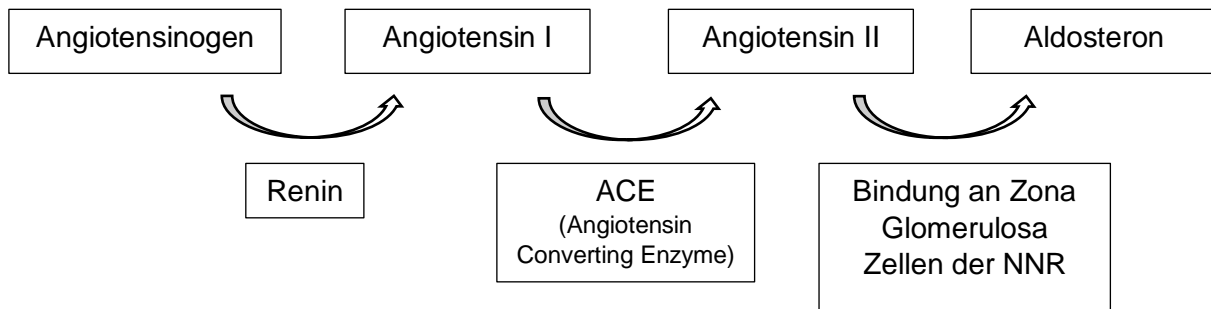


Abbildung 3 Darstellung des Renin – Angiotensin – Aldosteron Systems (RAAS). Angiotensinogen wird durch das Enzym Renin, welches von spezialisierten Zellen der Niere, den juxtaglomerulären Zellen, sezerniert wird, zu Angiotensin I gespalten. Ang I wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zu Ang II gespalten. Ang II bewirkt an den Blutgefäßen eine Vasokonstriktion und kann an Rezeptoren der Zona Glomerulosa Zellen der Nebennierenrinde binden. Dort führt Ang II über in **Abb. 4** dargestellte Mechanismen zu einer vermehrten Aldosteron Ausschüttung.

Bei Patienten mit einem PHA wird Aldosteron autonom gebildet, unabhängig vom Blutdruck oder Blutvolumen. Das führt zu einem dauerhaften Anstieg des Blutdrucks und infolgedessen zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko.

Zum Verständnis der Ursachen des PHA wurden in den letzten Jahren durch moderne Sequenzieretechniken wichtige Erkenntnisse gewonnen: Es wurden Mutationen in diversen Ionenkanälen festgestellt, die bei Patienten mit PHA gehäuft auftreten. Jedoch kann nicht bei jedem Patienten mit PHA eine ursächliche Mutation identifiziert bzw. einer Mutation Krankheitswert zugeschrieben werden.

In dieser Doktorarbeit wurde der Fokus, auf den in Zona Glomerulosa Zellen exprimierten, spannungsaktivierten Calcium-Kanal CACNA1H (Cav 3.2) gelegt. Wie dieser Kanal bei der Produktion von Aldosteron beteiligt ist, wird in 1.3 erklärt. Zuvor soll dort aber auf das Peptidhormon Ang II eingegangen werden, welches unter physiologischen Bedingungen ein Hauptstimulator für die Aldosteronproduktion der Zona Glomerulosa Zellen darstellt und seine Wirkung unter anderem über den CACNA1H entfaltet.

1.3 Wirkmechanismus von Angiotensin II

Das Peptidhormon Ang II ist einer der Mitspieler im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), siehe **Abbildung 3**. Die Niere verfügt über spezialisierte Zellen, die einen verminderten Blutdruck oder eine verminderte Salz- bzw. Natriumkonzentration

detektieren und infolgedessen Renin endokrin sezernieren können. Renin wiederum ist ein Enzym, welches Angiotensinogen in Angiotensin I umwandelt. Das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) katalysiert im Anschluss die Reaktion von Angiotensin I zu Angiotensin II (Ang II). Im obigen Punkt wurde bereits erwähnt, dass Ang II auf die Zona Glomerulosa Zellen wirkt und zu einer erhöhten Aldosteronproduktion führt.

Doch welche molekularen Mechanismen spielen sich dort ab?

Ang II bindet über den Ang II Rezeptor Typ (AT1) an die Plasmamembran der Zona Glomerulosa Zellen. Der AT1-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, welcher bei Bindung in den aktiven Zustand überführt wird und zu einer Aktivierung der Phospholipase C führt. Diese hydrolisiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG).

IP₃ kann über einen ligandenaktivierten Ca²⁺-Kanal des glatten endoplasmatischen Retikulums (gER) zu einer Ca²⁺-Freisetzung ins Zytosol führen.

DAG inhibiert Kalium-Kanäle der TASK – Familie, was zu einer Depolarisation der Zelle beiträgt (Wilke et al. 2014). Diese Depolarisation der Zelle führt zur Öffnung der in der Zellmembran lokalisierten spannungsaktivierten Ca²⁺-Kanälen (Ca_v). Einer dieser Ca_v-Kanäle ist der bereits erwähnte CACNA1H. Dadurch bewirkt Ang II, zusätzlich zur Freisetzung von Ca²⁺ über IP₃ aus dem gER, über eine Depolarisation indirekt einen Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ ins Zytosol über die Plasmamembran.

Durch den erhöhten Ca²⁺-Spiegel in der Zelle werden mehrere Prozesse ausgelöst, wovon hier nur der Wichtigste besprochen wird: Ca²⁺ kann an das intrazelluläre Rezeptorprotein Calmodulin binden. Im Komplex aktivieren sie Ca²⁺/Calmodulin abhängige Kinasen (CaMK), welche wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren können. Infolgedessen kommt es zu einer vermehrten Transkription des Gens CYP11B2. CYP11B2 kodiert für die Aldosteronsynthese. Die Aldosteronsynthese ist das Enzym, das den letzten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Aldosteronsynthese katalysiert, siehe **Abbildung 3** (Bassett et al. 2004).

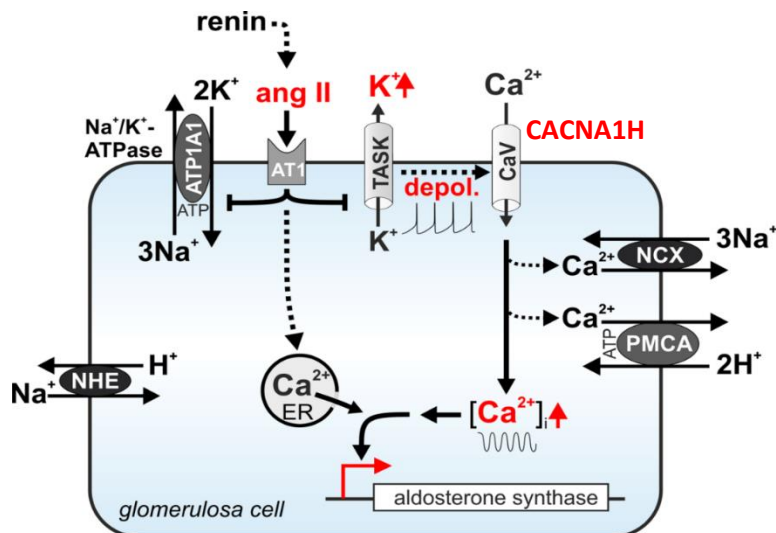


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Zona Glomerulosa Zelle. Diese Abbildung zeigt knapp die oben geschilderten durch Ang II ausgelösten Effekte. Durch die Membrandepolarisation werden Ca_v , wie der CACNA1H, geöffnet und es kommt zum Ca^{2+} -Einstrom. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration steigert die Expression des CYP11B2-Gens, welches für die Aldosteronsynthese kodiert. Die Abbildung zeigt zwei Transporter, die die Ca^{2+} -Konzentration der Zelle senken und sie so wieder auf den Ruhezustand zurückführen: NCX ist dabei ein Na^+/Ca^{2+} -Austauscher. PMCA steht für eine Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase. Unter Verbrauch von ATP transportieren PMCA Ca^{2+} gegen H^+ aus der Zelle. Eine extrazellulär erhöhte K^+ -Konzentration führt zu einer Depolarisation der Zelle und kann infolgedessen Ca_v – Kanäle wie den CACNA1H aktivieren. (Quelle: (Bandulik et al. 2019), Abbildung modifiziert).

Aber nicht nur indirekt über Depolarisation der Zelle scheint Ang II Ca_v -Kanäle beeinflussen zu können. So führt Ang II auch direkt zu einer Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Ca_v -Kanäle, wie z.B. einer Verschiebung der Aktivierungsschwelle zu negativerem Membranpotential. Außerdem scheint Ang II nicht nur einen aktivierenden, sondern auch einen inaktivierenden Einfluss auf die Ca_v -Kanäle nehmen zu können (Rossier 2016). Die regulierende Funktion von Ang II ist also komplex.

Dennoch wurde in der Literatur überwiegend die aktivierende Wirkung von Ang II auf Ca_v -Kanäle beschrieben. Man kann also sagen, dass ein über Ca_v -Kanäle wie CACNA1H vermittelter Ca^{2+} -Einstrom, in der Regel zu einer erhöhten Produktion von Aldosteron führt.

Es ist vorstellbar, dass Mutationen in CACNA1H zu einer pathologischen (Über-)Aktivität des Kanals führen, die Aldosteronproduktion autonom erhöhen und so

einen PHA bedingen können. Die nächsten Abschnitte stellen deshalb den Kanal genauer vor.

1.4 Der Ca_v -Kanal CACNA1H: Aufbau und Funktion

Spannungsaktivierte Calcium-Kanäle kommen in verschiedenen Zellen unterschiedlicher Organe vor. Nicht nur in Herzmuskelzellen und Nervenzellen spielen sie eine wichtige Rolle, sondern ebenso in den Zona Glomerulosa Zellen der Nebennierenrinde. Ca_v -Kanäle öffnen bei Depolarisation der Zelle und lassen selektiv Ca^{2+} -Ionen in das Zellinnere strömen. Diese Ca^{2+} -Ionen können je nach Zelle unterschiedliche Prozesse auslösen: in Muskelzellen kann beispielsweise eine Kontraktion ausgelöst oder in sekretorischen Zellen die Ausschüttung von Substanzen bedingt werden. Sie können auch, wie unter **1.3 Wirkmechanismus von Angiotensin II** beschrieben, zu vermehrter Transkription bestimmter Gene führen. Bei andauernder Depolarisation schließen sich die Ca_v -Kanäle spontan, was als Inaktivierung bezeichnet wird, siehe **1.4.2 Funktion**.

1.4.1 Aufbau

Calcium-Kanäle können in zwei Familien eingeteilt werden:

L-Typ Calcium-Kanäle: Diese Kanäle zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine starke Depolarisation brauchen, um aktiviert zu werden (high voltage activated - **HVA**). Nach Aktivierung bleiben sie dafür länger offen. Dieses Prinzip ist namensgebend: **Long-lasting current**, siehe **Abbildung 5**.

T-Typ Calcium-Kanäle: Diese Kanäle dagegen öffnen schon bei geringer Depolarisation (low voltage activated - **LVA**), aber inaktivieren dafür schneller: **Transient current**. Der CACNA1H gehört zur Familie der T-Typ Calcium-Kanäle, siehe **Abbildung 5**.

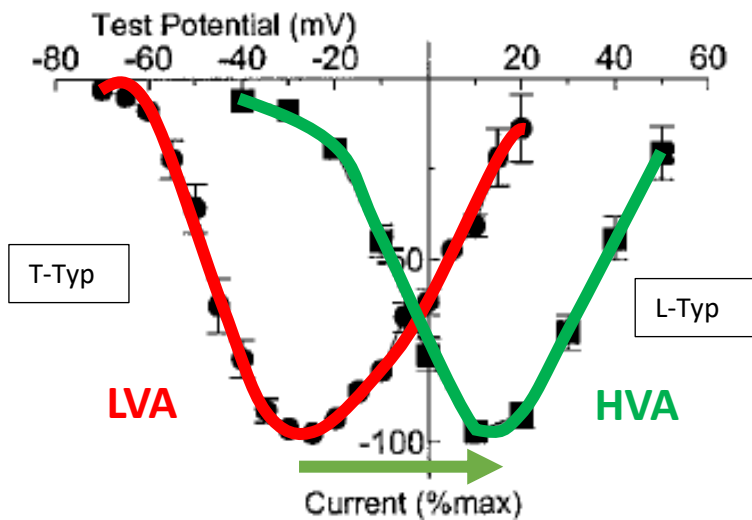


Abbildung 5 Strom – Spannung – Kurven von LVA und HVA Calcium – Kanälen. In dieser Abbildung werden die Spannungen in Millivolt (mV) gegen den Strom aufgetragen. Der Strom ist hierbei auf den maximalen Strom bezogen. Man unterscheidet HVA Calcium Kanäle, welche erst bei hohen Potentialänderungen im Vergleich zum Ruhepotential öffnen und LVA Calcium – Kanäle, die bereits bei geringen Potentialänderungen öffnen. Die in diesem Paper untersuchten HVA Kanäle aktivieren erst bei -40 mV und haben ihr Maximum bei +20 mV. Im Gegensatz dazu kann man bei den hier untersuchten LVA Kanälen bereits bei -60 mV eine Kanalaktivität detektieren und sie erreichen ihr Maximum bereits im negativen Potentialbereich von circa -30 mV. Außerdem wird die Zuordnung in dieser Abbildung nochmal dargestellt: T-Typ Calcium – Kanäle sind LVA, L-Typ Calcium – Kanäle HVA. (Quelle: (Cribbs et al. 1998), Abbildung modifiziert.)

Ca_V -Kanäle können aus $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, und δ -Untereinheiten bestehen (Catterall 2011). Die $\alpha 1$ -Untereinheit ist dabei porenbildend und enthält die Strukturen, die die Spannungsabhängigkeit der Kanäle bedingen. Sie bestehen aus 24 transmembranären α -Helices, wobei immer 6 transmembranäre Segmente (S1-S6) zu einer Untereinheit (I, II, III und IV) zusammengefasst werden (Dolphin 2012), siehe **Abbildung 6**. Die $\alpha 1$ -Untereinheit allein ist schon ausreichend, um einen funktionierenden Ca_V -Kanal zu generieren, allerdings weist dieser dann abnorme Kanaleigenschaften auf und die Expression des Kanals ist niedrig. Werden die anderen Untereinheiten $\alpha 2$, β und δ ko-exprimiert, so steigt die Expression und die Kanaleigenschaften normalisieren sich. Die $\alpha 2$ -, β -, und δ -Untereinheit können also auf die Spannungsabhängigkeit modulierend einwirken. (Catterall 2011). Da die $\alpha 2$ -Untereinheit und die δ -Untereinheit über Disulfidbrücken verbunden sind, spricht man auch von der $\alpha 2\delta$ -Untereinheit.

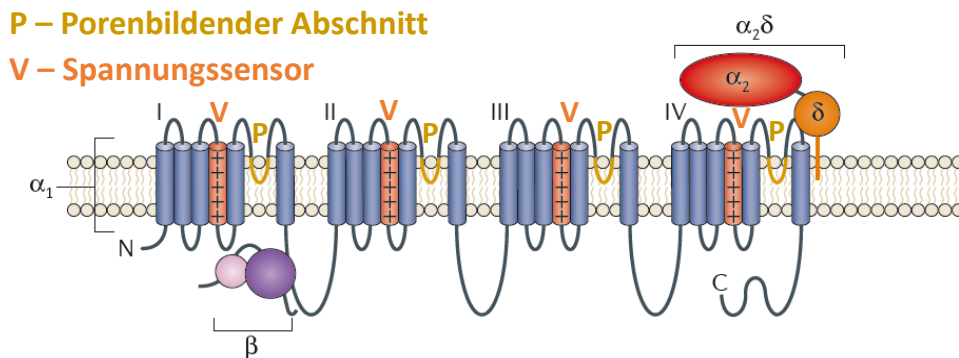


Abbildung 6 Aufbau eines spannungsabhängigen Calcium-Kanals (Ca_V). Ein Ca_V besteht aus α_1 , $\alpha_2\delta$ und β -Untereinheiten. Die α_1 Untereinheit wiederum setzt sich aus 4 Untereinheiten (I-IV), welche jeweils aus sechs transmembranären Segmenten (S1-S6) gebildet werden, zusammen. Das Segment S4 beinhaltet den Spannungssensor (in der Abbildung mit V gekennzeichnet). Die gelb markierten Schleifen sind porenbildend. (Quelle: (Dolphin 2012), Abbildung modifiziert).

Die α_1 -Untereinheit wurde sequenziert und abhängig von dieser Sequenzierung werden die Ca_V -Kanäle in drei große Untergruppen eingeteilt: Ca_V1 , Ca_V2 und Ca_V3 (Nowycky et al. 1985). Der CACNA1H gehört der letzten Gruppe Ca_V3 an (Dolphin 2012). Er kann auch als $Ca_V3.2$ beschrieben werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der CACNA1H ein LVA (low voltage activated) Ca_V3 -Calciumkanal vom T-Typ ist.

Eine weitere wichtige Struktur soll hier vorgestellt werden, und zwar das sogenannte *Gating Break*. Dabei handelt es sich um die proximal liegende schleifenförmige Struktur zwischen den Untereinheiten I und II, siehe **Abbildung 6**. (Arias-Olguín et al. 2008).

Mittels eines Programms wurde in diesem Paper die Sekundärstruktur für die I-II-Schleife vorausgesagt. Die Schleife soll eine Helix-Loop-Helix Struktur haben, wobei die erste Helix (H1) von Thr⁴²⁰ bis Leu⁴⁴¹ und die zweite Helix (H2) von Cys⁴⁵⁶ bis Trp⁴⁸² reicht. Zusätzlich soll eine Salzbrücke zwischen Glu⁴²⁴ in H1 und Lys⁴⁷⁰ oder Arg⁴⁷⁴ in H2 ausgebildet sein. Diese Angaben werden weiter unten wichtig, nämlich wenn es um die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen, ihre Lokalisation und deren möglichen Auswirkungen auf die Kanalfunktion geht (Arias-Olguín et al. 2008), siehe **1.4.2 Funktion** und **1.6 In dieser Doktorarbeit untersuchte Varianten: S475T und R788C**.

Am Anfang dieses Unterpunkts wurde erwähnt, dass Ca_v durch Depolarisation aktivieren und anschließend inaktivieren. Im Folgenden sollen diese Begriffe – Aktivierung und Inaktivierung – erklärt werden. Zusätzlich wird auf die Funktion des Gating Breaks eingegangen.

1.4.2 Funktion

Ca_v -Kanäle können offen oder geschlossen vorliegen. Durch Spannungsveränderungen können die Kanäle zwischen diesen beiden Konformationen wechseln. Die Geschwindigkeit, mit der der Wechsel abläuft, wird als Kinetik bezeichnet.

Eine initiale Depolarisation der Zelle (siehe **1.3 Wirkmechanismus von Angiotensin II**) führt dazu, dass sich Aminosäuren des Spannungssensors der Ca_v -Kanäle räumlich anders ausrichten. Durch diese Konformationsänderung kann sich der Kanal öffnen. Diesen Prozess nennt man **Aktivierung** (Catterall 2011). Bei CACNA1H findet die Aktivierung schon bei geringer Depolarisation statt (LVA), wobei das Maximum der Kanalaktivität des CACNA1H bei circa -50 mV erreicht ist (Cribbs et al. 1998), siehe **Abbildung 5**. Das Ruhepotential von Zona Glomerulosa Zellen liegt im Bereich von -78 mV bis -90 mV (Guagliardo et al. 2012).

Bei anhaltender Depolarisation folgt auf die Aktivierung die **Inaktivierung**, bei welcher der Kanal spontan schließt. Die Inaktivierung wird durch andere Strukturen des Kanals bedingt. Wie die Aktivierung wird die Inaktivierung durch die positive Ladung der Zelle bedingt, allerdings erfolgt die Inaktivierung zeitlich versetzt, sodass der Kanal öffnen kann und erst allmählich inaktiviert wird (Bähring und Covarrubias 2011). T-Typ Calcium-Kanäle wie der CACNA1H zeichnen sich im Vergleich zu L-Typ Calcium-Kanäle durch eine schnellere Inaktivierung aus (Cribbs et al. 1998), siehe **Abbildung 7**. Kanäle können in der Phase der Inaktivierung nicht neu aktiviert werden, unabhängig von der Höhe einer möglichen neuen Depolarisation. Die Inaktivierung ist meistens dann beendet, wenn sich die Zelle wieder im Ruhepotential befindet, also hyperpolarisiert ist.

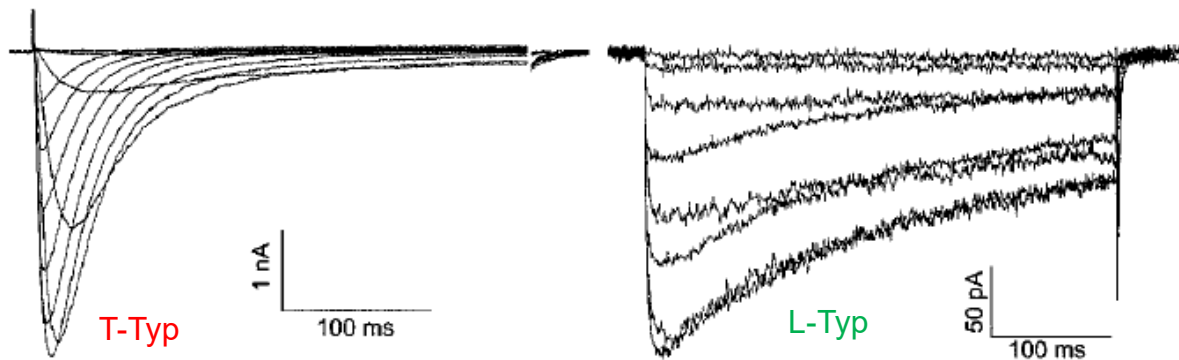


Abbildung 7 Inaktivierung von T-Typ und L-Typ Calcium – Kanälen. Dargestellt sind die Ströme in Nanoampere (nA) bzw. Pikoampere (pA) über die Zeit in Millisekunden (ms). Wie man erkennen kann, inaktivieren T-Typ Kanäle im Vergleich zu den L-Typ Kanälen schnell, was eine schnelle Reduktion des Stroms und damit einen deutlichen Strompeak zur Folge hat. L-Typ Kanäle dagegen inaktivieren nur langsam, weshalb die Kurve eine langgezogene Gestalt annimmt. (Quelle: (Cribbs et al. 1998), Abbildung modifiziert.)

Auch das in 1.4.1 vorgestellte Gating Break spielt eine wichtige Rolle bei der Kanalaktivierung und dessen Kinetik. In dem Paper von Arias-Olguin wird postuliert, dass diese Struktur nicht nur die Expression des Kanals mitbeeinflusst, sondern auch verhindert, dass T-Typ Calciumkanäle wie der CACNA1H schon bei Werten des Ruhepotentials aktiv werden. Die I-II-Schleife verhindert, dass Kanäle vorzeitig öffnen und bestimmt so die Kinetik der Kanäle mit. Auch die oben beschriebene Salzbrücke zwischen Glu⁴²⁴ in H1 und Lys⁴⁷⁰ oder Arg⁴⁷⁴ in H2 soll für die Kinetik des WT CACNA1H Kanals essenziell sein. Eine Zerstörung dieser Salzbrücke geht mit einem Öffnen des Kanals bei bereits negativerem Potential und Veränderungen der Kanalkinetik einher (Arias-Olguín et al. 2008), siehe **Abbildung 8**.

Als letztes wird erläutert, was unter dem Begriff **Deaktivierung** zu verstehen ist: Die Struktur im Spannungssensor, die die Aktivierung bedingt hat, kehrt in ihre Ausgangslage zurück und verschließt auf diese Weise den Kanal allmählich. Man erkennt in den Strom-Messungen einen sogenannten „Tail current“. Mit Abschluss der Deaktivierung befindet sich der Kanal wieder in geschlossener Konformation. Anders als in der Phase der Inaktivierung kann er aber durch eine abermalige ausreichende Depolarisation neu aktiviert werden. Außerdem repolarisiert die Zelle während der Phase der Deaktivierung, was bedeutet, dass die Triebkraft für positiv geladene Ionen ins Zellinnere während der Deaktivierung zunimmt (Karmažínová und Lacinová 2010).

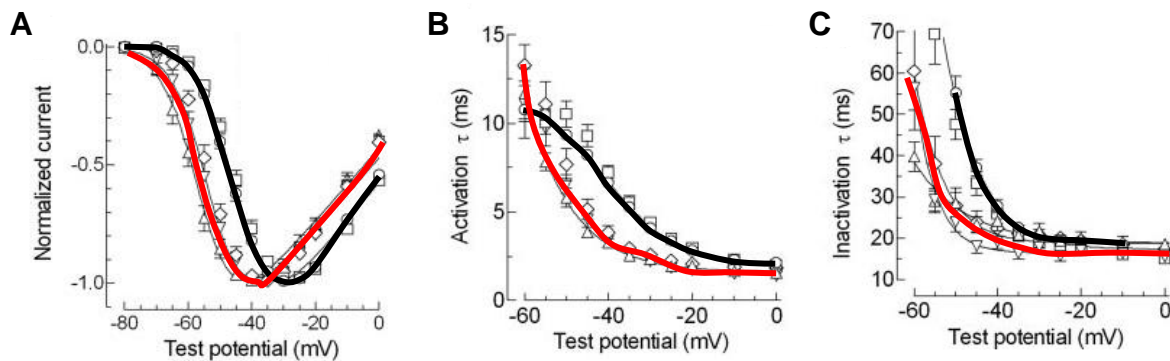


Abbildung 8 Veränderungen der Strom – Spannung – Kurve (A), der Aktivierung (B) und Inaktivierung (C) des CACNA1H bei Veränderungen des Gating Breaks. Es wurden verschiedene Strukturänderungen des Gating Breaks vorgenommen. In Rot sieht man die sich daraus ergebenden Veränderung der Strom – Spannungskurve und der Aktivierung und Inaktivierung im Vergleich zum Wildtyp (schwarz dargestellt). In A ist zu erkennen, dass sich die Kurve negativeren Werten verschiebt und so der Maximalstrom bereits bei Werten näher am Ruhepotential erreicht wird. In B wird die Aktivierung dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt der Kanal eine schnellere Aktivierung. In C kann man erkennen, dass die Mutationen auch zu einer schnelleren Inaktivierung des Kanals führen. (Quelle: (Arias-Olguín et al. 2008), Abbildung modifiziert.)

1.5 Mutationen des CACNA1H

Es ist leicht vorstellbar, dass Mutationen in den sensiblen Bereichen eines Kanals zu Störungen dieser Prozesse führen können. So wurde beispielsweise herausgefunden, dass somatische Mutationen in L-Typ Calcium-Kanälen die zweithäufigste genetische Auffälligkeit in Aldosteron produzierenden Adenomen sind (Rossier 2016). Auch beim CACNA1H als Vertreter der T-Typ Calcium-Kanäle wurden bereits Mutationen beschrieben, die zu pathologischer Kanalaktivität führen. Im Folgenden soll kurz eine bereits bekannte Mutation des CACNA1H vorgestellt werden, die M1549V Mutation. Abschließend werden die Mutationen besprochen, die in dieser Doktorarbeit untersucht wurden.

1.5.1 Beschriebene Mutationen des CACNA1H

Eine Mutation, die die elektrophysiologischen Eigenschaften des CACNA1H stark verändert, ist die M1549V Mutation: CACNA1H^{M1549V}. Diese Mutation wurde erstmals im Jahr 2015 in einem eLIFE Artikel von Scholl et al. beschrieben (Scholl et al. 2015).

Von derselben Arbeitsgruppe wurde 2016 ein weiteres Paper veröffentlicht, welches unter anderem zeigt, dass Zellen mit der CACNA1H^{M1549V} Mutation im Vergleich zu WT CACNA1H unter Kontrollbedingungen ohne Stimulation bereits eine 7fach erhöhte CYP11B2 Expression in der Realtime PCR zeigen (Reimer et al. 2016).

Die Arbeitsgruppe Bandulik an der Universität Regensburg führte weitere Experimente mit CACNA1H^{M1549V} im adrenalen Zellmodell durch. Hier war es ebenfalls möglich eine Veränderung der Kinetik im Sinne einer schnelleren Aktivierung und Inaktivierung des Kanals, sowie eine Verschiebung der Strom-Spannungskurve hin zu negativeren Membranpotentialen beobachtet werden. Außerdem zeigten Zellen, die Kanäle mit dieser Mutation exprimierten, starke Oszillationen, sowohl des Membranpotentials als auch der zytosolischen Ca²⁺-Aktivität (Gürtler et al. 2020), siehe **Abbildung 9**.

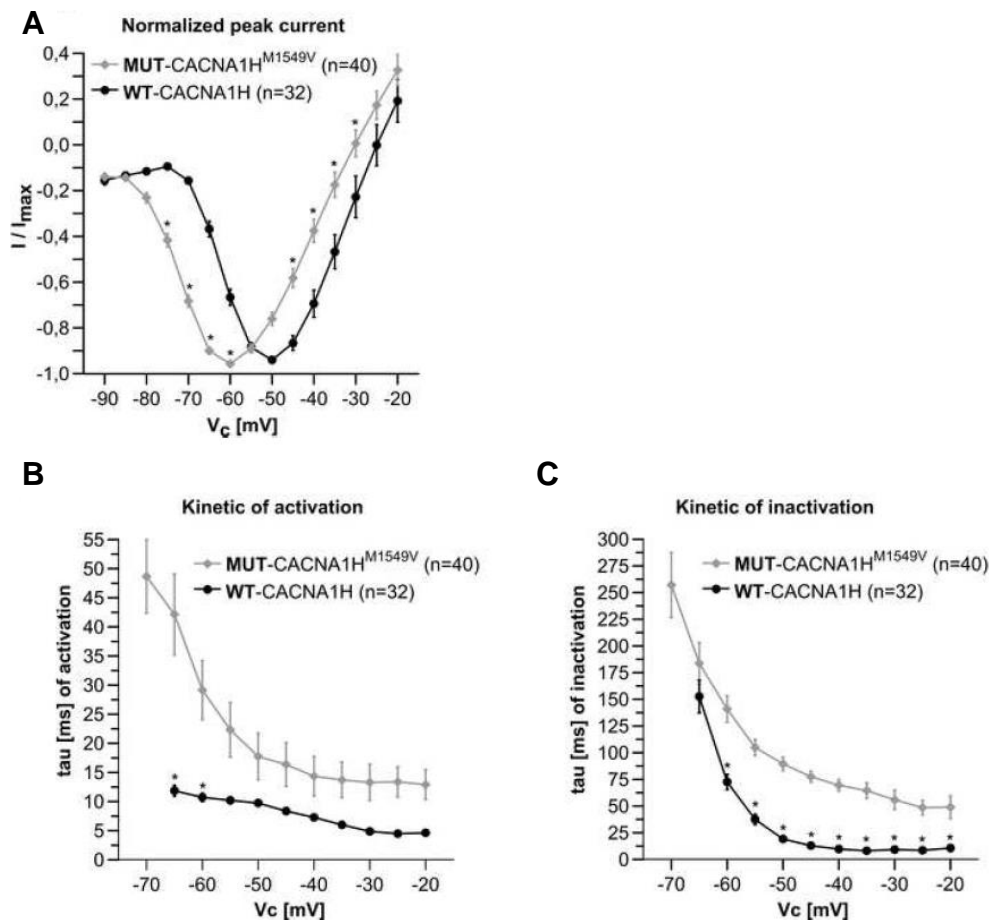


Abbildung 9 Vergleich der Strom-Spannungskurve von WT CACNA1H (schwarz) und CACNA1H^{M1549V} (grau) (A), sowie Darstellung der unterschiedlichen Kinetik mit Aktivierung (B) und Inaktivierung (C) von WT CACNA1H und CACNA1H^{M1549V}, gemessen an humanen NCI-H295R Zellen. In (A) kann man erkennen, dass die Mutante CACNA1H^{M1549V} im Vergleich zum WT CACNA1H bereits bei negativeren Spannungen öffnet und ihr Strommaximum bereits bei -60 mV erreicht. Der WT CACNA1H erreicht sein Strommaximum erst bei -50 mV. In (B) wird die Aktivierung dargestellt, die Zeit wird in [ms] gemessen. Die Mutante CACNA1H^{M1549V} aktiviert langsamer als der WT CACNA1H. In (C) wird die Inaktivierung dargestellt. Die Mutante CACNA1H^{M1549V} inaktiviert langsamer als der WT CACNA1H. (B) und (C) zeigen, dass die Mutante CACNA1H^{M1549V} die Kinetik des Kanals beeinflusst. (Quelle: (Gürtler et al. 2020), Abbildung modifiziert).

Eine weitere bekannte und krankheitsrelevante Mutation des CACNA1H ist R788C. Diese Variante wurde im Zusammenhang mit Epilepsie beschrieben. Da sie auch in dieser Doktorarbeit im Hinblick auf den Hyperaldosteronismus untersucht wird, wird sie unter **1.6.2 Die Variante R788C** vorgestellt.

1.6 In dieser Doktorarbeit untersuchte Varianten: S475T und R788C

Sascha Bandulik steht in Verbindung mit dem Endokrinologen Matthias Kroiß aus Würzburg, welcher eine Patientin mit Hyperaldosteronismus behandelt. Gene, welche im Zusammenhang mit PHA beschrieben sind, wurden bei dieser Patientin hinsichtlich Mutationen untersucht. Dabei wurden zwei Varianten im Gen für den CACNA1H entdeckt. Diese Varianten sind *S475T* (Ein Serinrest ist an Stelle 475 des Kanals durch ein Threoninrest ausgetauscht) und *R788C* (Ein Argininrest ist an Stelle 788 des Kanals durch ein Cysteinrest ausgetauscht). Beide Mutationen befinden sich im, unter **1.4.1 Aufbau** vorgestellten, Gating Break des CACNA1H, siehe **Abbildung 10**.

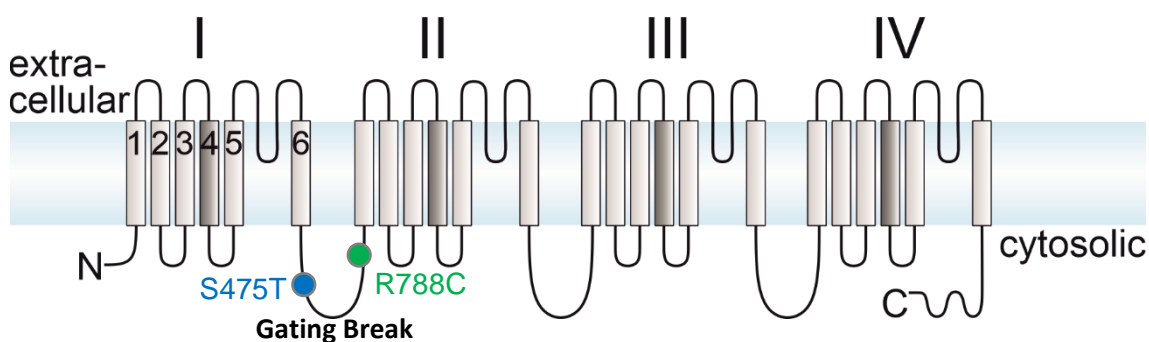


Abbildung 10 Lokalisation der in dieser Doktorarbeit untersuchten Mutationen *S475T* und *R788C*. Die Mutation *S475T* befindet sich an Stelle 475 in H2 des Gating Breaks. Damit liegt sie direkt neben dem für die Salzbrücke wichtigen Argininrest Arg⁴⁷⁴, siehe **1.4.1 Aufbau** und **1.4.2 Funktion**. Die Mutation *R788C* befindet sich auch im Gating Break, allerdings in H1.

1.6.1 Die Variante S475T

Bei dieser Variante ist ein Serinrest durch einen Threoninrest ersetzt. Die beiden Aminosäuren unterscheiden sich lediglich durch eine CH₃-Gruppe und sind sich deshalb in ihren chemischen Eigenschaften sehr ähnlich.

In **Abbildung 10** ist zu sehen, dass die Mutation *S475T* in H2 des Gating Breaks liegt. Direkt daneben an Stelle 474 befindet sich der Argininrest Arg⁴⁷⁴, der mit Glu⁴²⁴ die, für die Kanalfunktion wichtige, Salzbrücke bildet, siehe **1.4.2 Funktion**.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Mutation zu einer Veränderung der Kanalfunktion führt. Gerade ihre Nähe zu dem wichtigen Argininrest Arg⁴⁷⁴, ist dabei sehr interessant. Gleichzeitig ist es wegen der Ähnlichkeiten der beiden Aminosäuren – Serin und Threonin – fraglich, ob ein Austausch die Kanalfunktion beeinträchtigt.

Die Variante S475T ist bisher nicht in der Literatur beschrieben.

1.6.2 Die Variante R788C

Anders ist die Situation bei der Mutation R788C. Sie ist bereits bekannt und wird mit dem Auftreten von Childhood Absence Epilepsy (CAE), also Absence Epilepsien bei Kindern, assoziiert. Die dazu veröffentlichten Daten wurden an HEK-Zellen (Human embryonic kidney cells) erhoben (Vitko et al. 2005).

Auch die Variante R788C befindet sich in der I-II-Schleife, allerdings in der ersten Helix (H1), siehe **Abbildung 10**.

Die Aminosäuren unterscheiden sich stark voneinander. Während Arginin zu den basischen Aminosäuren zählt, ist Cystein neutral geladen. Cystein ist außerdem eine schwefelhaltige Aminosäure.

In dem Paper von Vitko zur Untersuchung der CAE wurde berichtet, dass die Variante R788C allein die Kinetik des Kanals bereits verändern (siehe **Abbildung 11**) und zusätzlich bei gleichzeitigem Auftreten mit einer anderen Mutation deren pathologischen Effekt verstärken kann (Vitko et al. 2005). Das ist besonders interessant, da die hier untersuchten Mutationen – S475T und R788C – ebenfalls gleichzeitig bei der Patientin auftreten. Allerdings muss das mit einer Einschränkung gesehen werden: Da die Gene der Eltern der Patientin nicht sequenziert wurden, ist nicht bekannt, ob die Patientin beide Mutationen auf einem Allel trägt (Compound Heterozygotie) oder je eine Mutation auf je einem Allel.

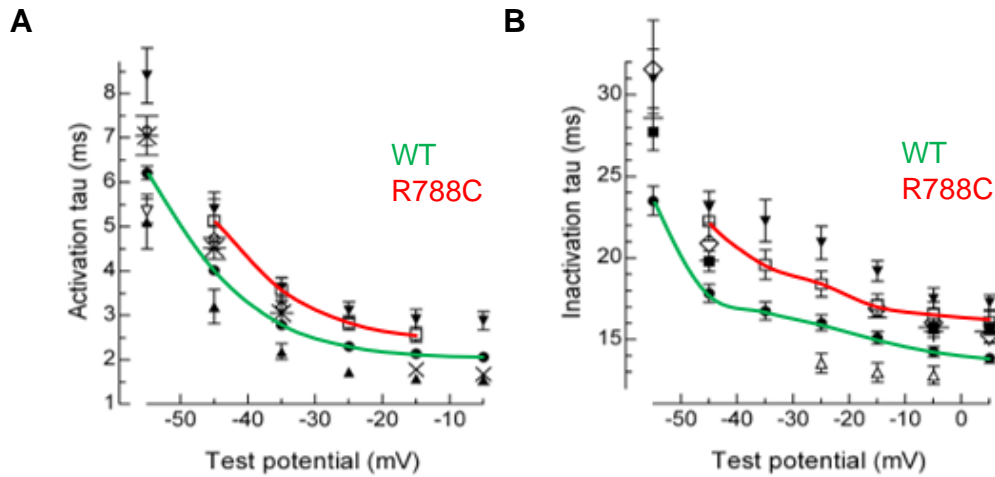


Abbildung 11 Effekte der Mutation R788C auf die Aktivierung (A) und Inaktivierung (B) des **CACNA1H**. Die Effekte der R788C Mutation sind hier in rot, der Wildtyp in grün dargestellt. In diesen Diagrammen ist erkennbar, dass die Aktivierung (A) und die Inaktivierung (B) durch die Mutation verlangsamt werden. Das bedeutet, der Kanal braucht zeitlich länger um zu öffnen, schließt aber auch verspätet. (Quelle: (Vitko et al. 2005), Abbildung modifiziert).

2. Zielsetzung

Ziel dieser medizinischen Doktorarbeit war es, herauszufinden, ob die bei der Patientin detektierten Mutationen CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} oder deren Kombination CACNA1H^{S475T/R788C} zur Entstehung eines Primären Hyperaldosteronismus beigetragen haben könnten.

Dafür wurden NCI-H295R-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche die genetische Information für den WT CACNA1H, CACNA1H^{S475T}, CACNA1H^{R788C} und CACNA1H^{S475T/R788C} trugen. Anschließend sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen mittels Whole-Cell Patch Clamp Technik untersucht werden.

Zusätzlich sollte mittels quantitativer Realtime-PCR herausgefunden werden, ob die Mutationen Einfluss auf die Genexpression von CYP11B2 haben.

Im Gesamten sollte die medizinische Arbeit einen Beitrag zur Forschung an Erkrankungen, die mit Bluthochdruck einhergehen, insbesondere dem Primären Hyperaldosteronismus, leisten.

3. Material und Methoden

In diesem Abschnitt wird dargestellt, mit welchen Materialien gearbeitet und welche Methoden angewendet wurden. Damit können die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wiederholt werden.

3.1 Material

Als erstes folgt eine Darstellung der Materialien.

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC
Axiovert 10 Mikroskop	Carl Zeiss AG
Benchmark Microplate-Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH
Brutschrank	Heraeus Instruments
DMZ Universal Puller	Zeitz Instruments GmbH
inoLab® pH/ION 7320	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG
Light Cycler LC480	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
NanoDrop™ 3300	Thermo Scientific, NanoDrop products
Neon® Transfection System	Invitrogen/Life Technologies Ltd.
PatchStar Micromanipulator	Scientifica Ltd
Peristaltic perfusion system PPS2	Multi Channel Systems MCS GmbH
Verstärker EPC-10	HEKA Elektronik GmbH
Wasserbad	Haake W19

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
DynaBeads CD8	Invitrogen/Life Technologies Ltd.
Falcon Dish	Thermo Fisher Scientific
Glasplättchen	Hartenstein A. Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik
Patch-Glaskapillaren	Harvard Apparatus
Silikon Hochvakuumfett	COSIMOL Hannover

3.1.3 Programme

Programm	Anbieter
FitMaster	HEKA Elektronik GmbH
LabChart Reader	AD Instruments Ltd
PatchMaster	HEKA Elektronik GmbH

3.1.4 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	VWR
Angiotensin II	tu-Aldrich Co. LLC
ATP Na ₂	Sigma-Aldrich Co. LLC
Bovine Albumine Fraction V	Thermo Fisher Scientific Inc.
Bovine Fibronectin	PromoCell GmbH
CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co KG
Collagen from calf skin	Sigma-Aldrich Co. LLC
D-Kaliumgluconat	Sigma-Aldrich Co. LLC
EGTA	Sigma-Aldrich Co. LLC
F-12 Nut Mix (Ham)	Capricorn Scientific GmbH
MidoriXtra	NipponGenetics
Glukose	Merck KGaA
GTP Na ₂	Sigma-Aldrich Co. LLC
HEPES	AppliChem GmbH
K ₂ HPO ₄	Merck KGaA

KCl	Merck KGaA
KH ₂ PO ₄ *3H ₂ O	Merck KGaA
MgCl ₂ * 6H ₂ O	Merck KGaA
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA
NaCl	Merck KGaA
NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA
Penicillin-Streptomycin	Capricorn Scientific GmbH
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Gibco Cell Culture Systems, Invitrogen

3.1.5 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Endkonzentration oder Volumen
ATP-Pipettenlösung	K ⁺ -Gluconat KCl NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ Glucose MgCl ₂ CaCl ₂ EGTA ATP Na ₂ pH 7,2 (eingestellt mit KOH oder HCl) in Aqua dest.	95 mmol/L 30 mmol/L 1,2 mmol/L 4,8 mmol/L 5 mmol/L 2,38 mmol/L 0,73 mmol/L 1 mmol/L 3 mmol/L
Coating-Medium	F-12 Nut Mix (Ham) Bovine Fibronectin 1mg/ml Collagen from calf skin 0.1% Solution Bovine Albumine Fraction V 7.5% Pen/Strep 100x	97 ml 1 ml 1 ml 50 µl 1 ml
GTP-Pipettenlösung	K ⁺ -Gluconat	95 mmol/L

	KCl NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ Glucose MgCl ₂ CaCl ₂ EGTA ATP Na ₂ GTP Na ₂ pH 7,2 (eingestellt mit KOH oder HCl) in Aqua dest.	30 mmol/L 1,2 mmol/L 4,8 mmol/L 5 mmol/L 2,38 mmol/L 0,73 mmol/L 1 mmol/L 3 mmol/L 0,040 mmol/L
NCI-Zellmedium +P/S (von CLS)	Hepes Insulin Transferrin Selenium BSA Linolsäure Nu-Serum I Penicillin G Streptomycin In einer 1:1 Mischung aus: Ham's F-12 und Dulbecco's modified Eagle's Medium	15 mmol/L 6,25 µg/mL 6,25 µg/mL 6,25 ng/mL 1,25 mg/mL 5,35 µg/mL 2,5% 100 U/mL 100 µg/mL
PBS-Puffer, pH 7,4	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl in Aqua dest.	1,8 mmol/L 10,3 mmol/L 137 mmol/L
Ringer-Lösung 10x	Hepes NaCl KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O In Aqua dest.	50 mmol/L 1136mmol/L 4 mmol/L 16 mmol/L

Ringer-Lösung 1x, pH 7,4	10xfach Ringer MgCl ₂ 1M CaCl ₂ 1M NaCl 5M Glukose In Aqua dest.	1 mmol/L 1,3mmol/L 31,4 mmol/L 5 mmol/L
--------------------------	---	--

3.1.6 Oligonukleotide

β-Actin-se: CCAACCGCGAGAAGATGA	β-Actin-as: CCAGAGGCGTACAGGGATAG
CYP11B2-se: CACCACGTGCTGAAGCACT	CYP11B2-as: CCTGGGTGCAGATGCAAGAC

3.1.7 Plasmide

Das pIRES-CD8-Plasmid mit der kodierenden WT-CACNA1H Sequenz wurde wie in Gürtler et al., 2020 beschrieben kloniert (Gürtler et al. 2020). Die zwei weiteren Mutationen (S475T und R788C) wurden durch Site-directed mutagenesis durch Janina Herold (R788C) im Rahmen ihrer Bachelorarbeit bzw. durch Ines Tegtmeier aus unserer Arbeitsgruppe eingefügt.

3.1.8 Verwendete Zellen

Es wurde mit (Fa. CLS) gearbeitet. Dabei handelt sich um eine Zelllinie aus humanen adrenokortikalen Karzinomzellen, welche ein anerkanntes Aldosteron-produzierendes Modell für die Nebennierenforschung darstellen.

3.2 Methoden

Im Folgenden werden die Methoden dargestellt. Neben Zellkultur und Transfektion der Zellen war insbesondere die Patch-Clamp-Technik von Relevanz.

3.2.1 Aussäen von NCI-H295R-Zellen und Vorbereiten für die Transfektion

Die Kultur der NCI-H295R-Zellen erfolgte im zelllinienspezifischen DMEM/F12 – Medium (CLS) mit 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in der Umgebungsluft im Brutschrank gehalten.

Für das Patchen wurden die Zellen in Falcon Dishes auf Glasplättchen ausgesät. Dafür wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mittels 4 mL Trypsin/EDTA für 10 Minuten im Brutschrank vom Flaschenboden abgelöst, in 8 mL Nährmedium überführt und 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 mL Nährmedium resuspendiert.

Pro Schale sollten 1,5-2 Millionen Zellen ausgesät werden. Das entsprechende Volumen wurde in ein Eppi überführt und 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL PBS resuspendiert und abermals für 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in R-Puffer resuspendiert. Dafür wurde pro Schale 120 µL R-Puffer eingerechnet.

Anschließend wurde die Transfektion mittels der Methode der Elektroporation durchgeführt.

3.2.2 Transiente Transfektion-Elektroporation

Für die Transfektion wurde die Methode der Elektroporation gewählt. Die Transfektion wurde nach Vorgaben des Neon® Transfection System 100 µL durchgeführt.

Unter Transfektion versteht man das Einbringen fremden DNA-Materials in die Zellen, sodass Gene, die auf dieser Fremd-DNA kodiert sind, von der Zelle exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde eine transiente Transfektion durchgeführt, das heißt, die DNA wird aufgenommen, aber nicht fest in das Genom der Zelle übernommen. Die fremde DNA ist hierbei auf Plasmiden kodiert. Neben der genetischen Information für das Zielprotein befindet sich auch die kodierende Sequenz für das CD8 Protein, welches

als Oberflächenmarker transfizierter Zellen dient. Elektroporation bedeutet hierbei, dass die Zellen kurzzeitig einem Strom ausgesetzt werden. Das führt dazu, dass die Zellmembran durchlässig wird und die Plasmide in die Zelle aufgenommen werden können.

Für die Transfektion wurden pro Schale 5 μL Plasmid eingesetzt. Vier Plasmide mit CD8 Vektor wurden verwendet:

- WT CACNA1H
- CACNA1H^{S475T/R788C}
- CACNA1H^{S475T}
- CACNA1H^{R788C}

Mit einer speziellen Pipette, welche gleichzeitig als Elektrode fungiert, wurden 100 μL der Zellsuspension in R-Puffer mit Plasmiden aufgenommen, die Pipette in ein spezielles Gefäß, befüllt mit E-Puffer, gesetzt und elektroporiert (Programm: 1 Puls, 40 ms, 1100 V).

Die 100 μL wurden dann in ein Falcon Dish mit Glasplättchen und 2 mL Penicillin/Streptomycin freiem Nährmedium überführt und das Dish geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen.

Anschließend wurden die Zellen für 24 bzw. 48 Stunden in den Brutschrank gestellt und mittels Patch Clamp Methode gemessen.

3.2.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen

Es gibt verschiedene Arten der Patch Clamp Technik. In dieser Arbeit wurde die Whole-Cell Methode angewendet.

Bei dieser Methode wird mit einer Pipette an die Zellmembran herangefahren und ein Gigaseal hergestellt. Anschließend wird durch das Anlegen eines Unterdrucks die Membran eingerissen und auf diese Weise ein Kontakt mit dem Cytoplasma hergestellt. Die Membran legt sich dabei innen an die Pipette fest an und es können Ströme über die Zellmembran gemessen werden.

Da durch die transiente Transfektion der CACNA1H-Kanal in den Zellen überexprimiert ist, werden hauptsächlich diese Calcium-Ströme gemessen. Zellen, bei denen die Transfektion erfolgreich war, wurden vor dem Patchen mit Dynabeads (Zellen mit 3 μL

Dynabeads auf 1mL Ringer-Lösung für 3 Minuten unter Schwenken inkubieren) markiert.

Die Patch Clamp Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die Zellen konstant mittels des Perfusionssystems mit Ringer-Lösung (RT, 3,6 mM Kalium, pH = 7,4) umspült. Als Pipettenlösung wurde entweder eine Lösung mit ATP oder ATP und GTP verwendet (siehe **3.1.5 Lösungen und Puffer**). Diese Pipettenlösung wurde in Aliquots bei -20°C tiefgefroren und am Messtag nach Bedarf aufgetaut. In Kapitel **5. Diskussion** wird detaillierter erläutert, aus welchem Grund zwei unterschiedliche Pipettenlösungen für dieses Experiment verwendet wurden.

Das Glasplättchen, auf welchem die Zellen 24h bzw. 48h wuchsen, wurde mittels Silikonfett an der Perfusionskammer befestigt, am inversen Mikroskop eingespannt und ans Schlauchsystem des Perfusionsgeräts angeschlossen. Wichtig für eine störungsfreie Messung ist hierbei sicherzustellen, dass der Badspiegel konstant bleibt. Dafür bietet es sich an, den Abflussschlauch vor Einspannen der Zellen mit Paraffin zu spülen. Der Abfluss perlt dann gleichmäßig und die Messungen sind weniger störanfällig.

Die Patch-Pipette wurde an einem Puller selbst gezogen und poliert. Verwendet wurden hierfür Kapillaren mit Filament. Dabei wurde ein Pipettenwiderstand zwischen 6 MO und 10 MO akzeptiert.

Nachdem ein Zugang zur Zelle hergestellt wurde, wurden die Zellen bzw. die Calcium-Kanäle durch Spannungspulse stimuliert (Voltage-Clamp-Modus). Dafür wurde mittels des PatchMaster Programms ein Protokoll angefertigt, welches wie folgt aussieht:

Zunächst wird die Zelle für 100 ms auf -100 mV geklemmt.

Anschließend wird eine Spannungstreppe von -90 mV bis +45 mV durchlaufen, wobei die Spannungen für jeweils 800 ms gehalten werden und die Treppe in 5 mV Schritten durchgeführt wird. Die Zelle wird nach jedem Schritt für 300 ms abermals auf -100 mV geklemmt.

Mit dem Klemmen auf -100 mV möchte man sicherstellen, dass die Calcium-Kanäle komplett deaktiviert sind, bevor eine neue Spannung angelegt wird.

Das Programm LabChart wurde zeitgleich ausgeführt und die Veränderungen von Strom und Spannung erfasst.

Es ist möglich den Strom manuell einzustellen und die Zelle auf eine bestimmte Spannung zu klemmen. In diesem Fall wurden die Zellen auf -80 mV geklemmt. Dieser Wert ergibt sich aus vorherigen Experimenten, bei denen Zellen (CACNA1H^{M1549V}) bei dieser Spannung zu oszillieren begannen.

Nachdem diese Patch Clamp Messungen in hoher Anzahl durchgeführt wurden, sollte dann noch untersucht werden, wie sich eine Stimulation der Zellen mit Angiotensin II auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des CACNA1H auswirkt.

3.2.4 Stimulation mit Angiotensin II während Patch Clamp

Angiotensin II führt physiologisch zu einer vermehrten Aldosteron Ausschüttung von Zona Glomerulosa Zellen der Nebenniere. Diese vermehrte Hormon-Ausschüttung wird auch über den CACNA1H vermittelt.

Es soll überprüft werden, ob Angiotensin II bei Calciumkanälen, die eine oder beide Mutationen S475T bzw. R788C tragen, eine andere Wirkung entfaltet als beim Wildtyp Kanal.

Dafür wurden an den Zellen zunächst wie unter Normalbedingungen Messungen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 500 pM Ang II bzw. 10 nM Ang II Ringer-Lösung stimuliert. Nach Umhängen des Schlauchsystems in die Stimulationslösungen wurde vier Minuten bis zur Messung gewartet, da nach dieser Zeit von einem kompletten Austausch der Badlösung ausgegangen werden kann.

Für die Stimulationsexperimente wurde statt der ATP-Pipettenlösung die GTP-Pipettenlösung verwendet. Außerdem wurden die Zellen nach Transfektion 48 Stunden statt 24 Stunden inkubiert.

3.2.5 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde aus NCI-H295R Zellen isoliert. Die Zellen wurden am Vortag transfiziert mit:

- WT CACNA1H
- CACNA1H^{S475T/R788C}
- CACNA1H^{S475T}

- CACNA1H^{R788C}
- Leervektor

Es wurden 2 Millionen Zellen pro Schale ausgesät.

Vor der RNA Isolation wurden die Zellen zweimal mit RINGER-Kontrolllösung pH 7,4 gewaschen.

Die Isolation wurde nach der Anleitung des Herstellers mit dem „Nucleo-Spin RNA“ Kit der Fa. Machery/Nagel durchgeführt. Bei Raumtemperatur wurde 15 Minuten lang mit DNase verdaut. Die Elution fand in 40µL Rnase-freiem Wasser statt.

Danach wurde die RNA auf einem 1%-Agarose Gel nachgewiesen und die Konzentration am NanoDrop-Gerät bestimmt.

3.2.6 Realtime-PCR

Aus der aufgereinigten RNA wurde mittels Reverser Transkription cDNA hergestellt. Dafür wurden die M-MLV Reverse Transkriptase (Promega) und Random Hexamer Primer (Thermo scientific) verwendet. Pro Probe wurde 1µg RNA eingesetzt.

Die Realtime-PCR wurde am LightCycler 480 (Roche) durchgeführt, wobei spezifische Primer (Invitrogen) und ein SYBR Green Master Mix (Takyon Mix) verwendet wurden.

Die relative Expression der Zielgene wurde auf die β -aktin Expression normalisiert.

Es wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, sowie eine Gelelektrophorese der amplifizierten Proben, um die Spezifität der PCR zu verifizieren.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt. Es wurden Realtime-PCRs und Whole-Cell Patch Clamp Experimente durchgeführt.

4.1 Expression des Gens CYP11B2 in adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid und Mutation(en) tragenden Plasmiden

Es sollte untersucht werden, ob Mutationen des CACNA1H die Expression des CYP11B2 Gens bereits unter Normalbedingungen beeinflussen und so sekundär zu einer veränderten bzw. vermehrten Aldosteron Produktion führen können.

Dafür wurde eine Realtime – PCR bei Zellen, die 24h davor per Elektroporation transfiziert wurden, durchgeführt. Folgende Plasmide wurden verwendet:

- CD8 Leervektor
- WT CACNA1H
- CACNA1H^{S475T/R788C}
- CACNA1H^{S475T}
- CACNA1H^{R788C}
- CACNA1H^{M1549V}

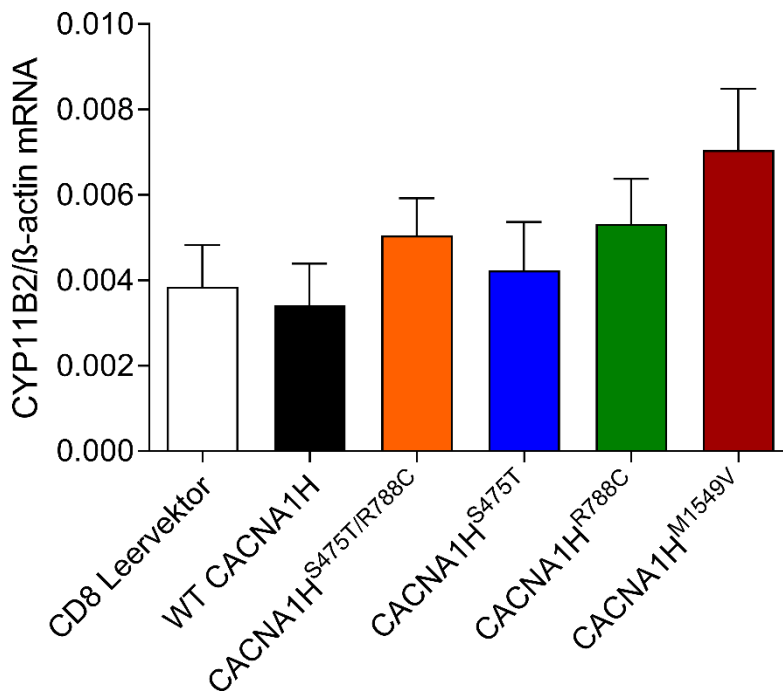


Abb. 12 Relative Expression von CYP11B2 mRNA (Haushaltsgen β -Aktin als Referenz, unter Berücksichtigung der Effizienz). Nach Transfektion wurden die Zellen 24h kultiviert. Für jede Gruppe gilt $n=6$.

In **Abb. 12** wird die Höhe der Expression von CYP11B2 zwischen WT CACNA1H Zellen und Zellen, die Mutationen in diesem Kanal tragen, verglichen. Dabei ist zu erkennen, dass die mutationstragenden Gruppen im Vergleich zum WT CACNA1H eine Tendenz zu einer höheren CYP11B2 Expression zeigen. Das ist besonders auffällig bei dem in bereits anderen Arbeiten untersuchten CACNA1H^{M1549V}, welcher hier zur besseren Vergleichbarkeit auch untersucht wurde. Im Vergleich zu WT CACNA1H zeigt er eine circa doppelt so hohe Expression für CYP11B2. Ebenfalls eine Tendenz zu höherer Expression von CYP11B2 zeigen der Genotyp CACNA1H^{S475T/R788C} und CACNA1H^{R788C}. Ob diese Unterschiede signifikant sind, wurde mit einem einfaktoriellen ANOVA Test geprüft.

Dafür wurden die Gruppen zunächst hinsichtlich ihrer Normalverteilung und Varianzhomogenität hin untersucht:

Die Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov Test geprüft. Dabei zeigten alle Gruppen außer CD8 Leervektor eine Normalverteilung. Da der ANOVA Test nach

neueren Studien relativ robust ist, auch wenn keine Normalverteilung in allen Gruppen vorliegt, wurde dennoch weiter mit ANOVA ausgewertet.

Die Überprüfung der Varianzhomogenität erfolgte mit dem Levene-Test, gemäß dem man eine Gleichheit der Varianzen annehmen kann ($p = 0,541$).

Anschließend wurde ein einfaktorieller ANOVA Test durchgeführt.

Es konnten in diesem Versuch keine signifikanten Unterschiede in der CYP11B2 Expression zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden ($p = 0,231$).

4.2 Whole-Cell Patch Clamp Messungen an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden

Für die Experimente wurden folgende Plasmide verwendet:

- WT CACNA1H
- doppelt mutiert CACNA1H^{S475T/R788C}
- einfach mutiert CACNA1H^{S475T}
- einfach mutiert CACNA1H^{R788C}

Wie unter **3.2.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen** beschrieben wurden Strom-Spannungskurven aufgenommen und die Aktivierung und Inaktivierung des CACNA1H untersucht.

4.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und Mutation(en)-tragendem CACNA1H

Bevor in 4.2.2 auf die Kinetik des Kanals eingegangen wird, werden hier die Strom-Spannungskurven dargestellt. Zu beachten ist, dass in manchen Experimenten ausschließlich ATP als Zusatz in der Pipettenlösung verwendet wurde. In anderen wurde neben ATP auch GTP hinzugefügt, zur Erklärung siehe **5. Diskussion**. Die Experimente werden getrennt voneinander dargestellt. Dabei wurden die Experimente mit CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} mit ausschließlich ATP durchgeführt.

In **Abbildung 13** wurden die Ströme durch den Maximalstrom dividiert ($I/I(\max)$), um so die Höhe des Stroms zu relativieren und die Form der Kurve besser miteinander

vergleichen zu können. In **Abbildung 13 (A)** werden alle Kanalentitäten dargestellt, in den Untergruppen (B)-(E) wird dann jeweils der Wildtyp mit einem mutierten Kanal verglichen. Wie man gut erkennen kann, unterscheidet sich die Form der Kurven im Bereich zwischen -90 mV und -40 mV gar nicht bzw. minimal. Der Peak-Strom wird bei CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} im Vergleich zum Wildtyp bei der gleichen Spannung erreicht, welche bei circa -50 mV liegt. Ebenso verhält es sich für CACNA1H^{S475T/R788C} mit ATP und GTP in der Pipettenlösung. Lediglich der doppelt mutierte CACNA1H^{S475T/R788C} zeigt in der Serie mit ATP-haltiger Pipettenlösung (ohne GTP) eine leichte Rechtsverschiebung hin zu positiveren Werten.

Es wurde ein multifaktorieller ANOVA Test mit Prism durchgeführt. Der Test ergab, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen existieren.

Außerdem wurde der Strom relativ zur Kapazität gerechnet, um so Unterschiede in der Stromhöhe bedingt durch die Zellgröße herauszurechnen (siehe **Abbildung 14**).

In **Abbildung 14 (A)** werden alle Kanalentitäten dargestellt, in den Untergruppen (B) – (E) wird jeweils der Wildtyp mit einem mutierten Kanal verglichen. Auch hier werden die Messungen mit ATP bzw. GTP getrennt voneinander dargestellt. Die Kurve von CACNA1H^{R788C} ist fast deckungsgleich zum Wildtyp, ein Unterschied in der Stromgröße kann daher nicht detektiert werden (siehe (B)). In (C) wird CACNA1H^{S475T} dargestellt. Es ist ein verminderter Strom im Vergleich zum Wildtyp CACNA1H erkennbar. CACNA1H^{S475T/R788C} zeigt unter ATP eine leichte Vergrößerung des Stroms im Vergleich zum Wildtyp CACNA1H, unter GTP ist diese Vergrößerung deutlich geringer ausgeprägt, die Kurve zeigt eine leichte Linksverschiebung hin zu negativeren Werten (siehe (D) und (E)).

Der hier durchgeführte multifaktorielle ANOVA-Test ergab keine signifikanten Ergebnisse.

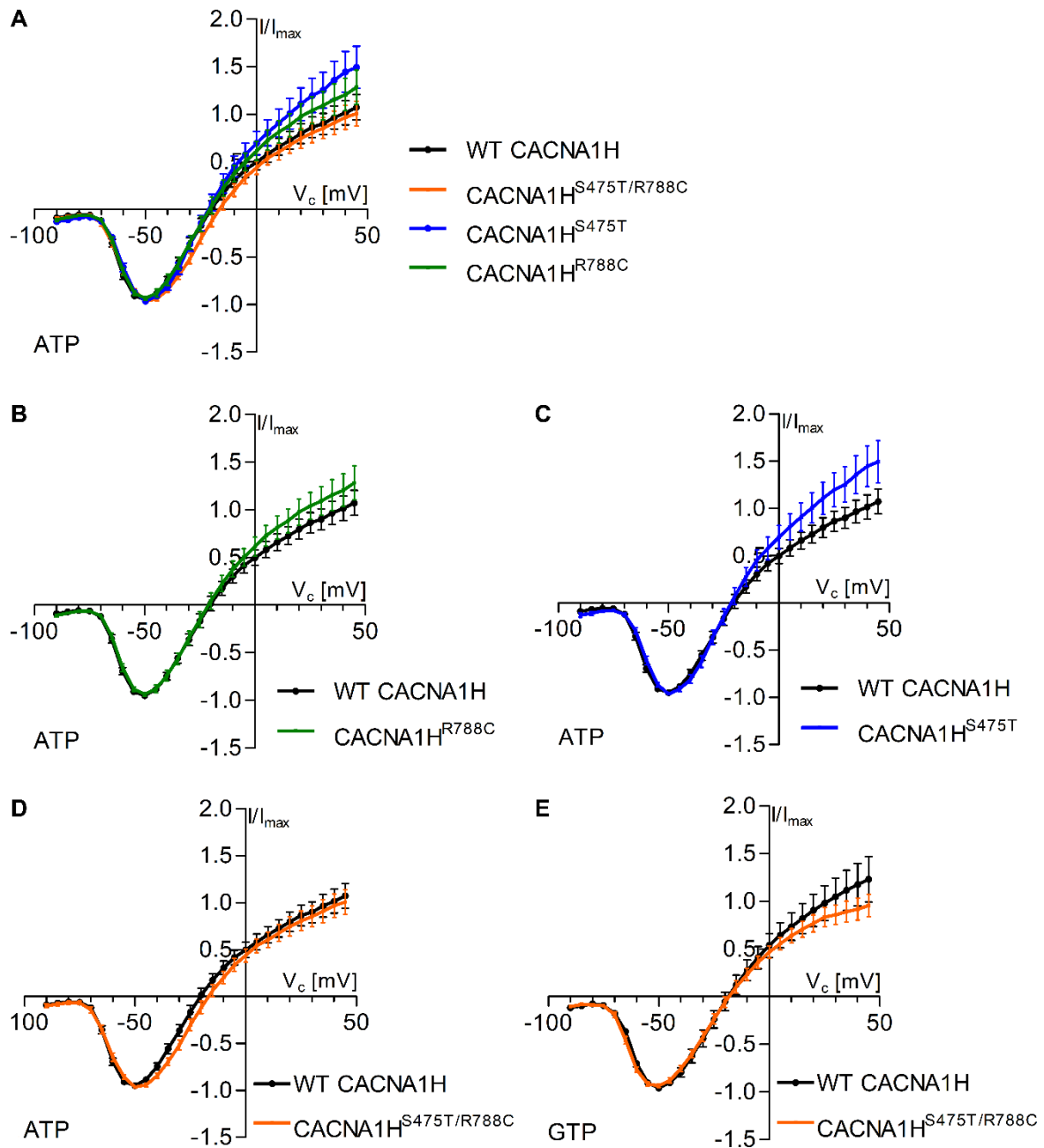
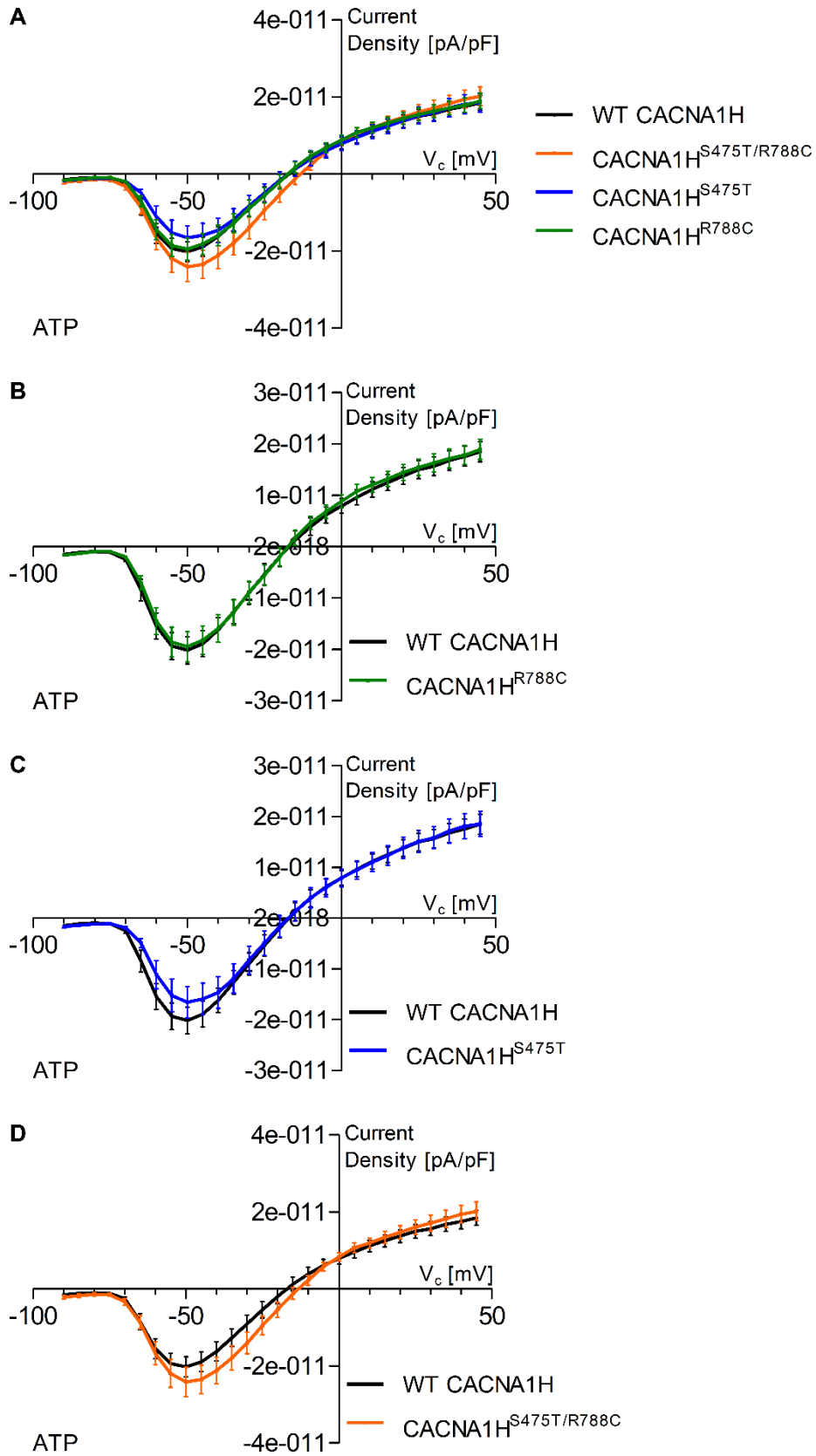


Abbildung 13 Strom-Spannungskurven relativiert auf den Peakstrom I_{max} , gemessen an adrenalen NCI-H295R Zellen. Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H, $n=25$ für ATP und $n=30$ für GTP (schwarz), CACNA1H^{S475T/R788C}, $n=19$ für ATP und $n=35$ für GTP (orange), CACNA1H^{S475T}, $n=19$ (blau) und CACNA1H^{R788C}, $n=21$ (grün) transfizierten Zellen durchgeführt. Zu beachten ist, dass ein Teil der Messungen an CACNA1H^{S475T/R788C} mit ATP in der Pipettenlösung und der andere Teil mit zusätzlich GTP in der Pipettenlösung durchgeführt wurden. Diese Messungen werden getrennt voneinander dargestellt (siehe (D) und (E)). In (A) werden alle (unter ATP) untersuchten Gruppen dargestellt. In (B) – (E) wird der WT CACNA1H dann mit je einer Mutante verglichen. Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K^+) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -90 mV bis +45 mV durchschritten.



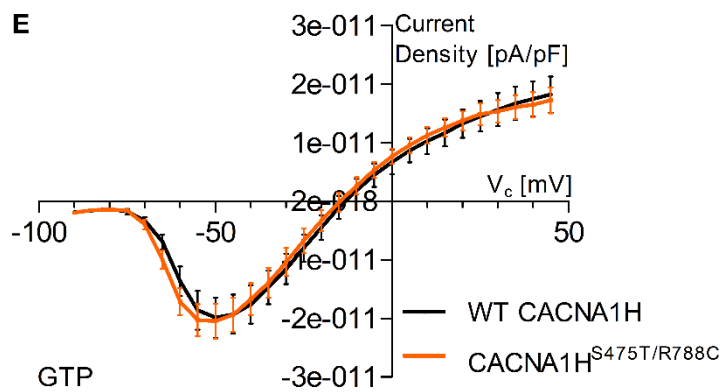


Abbildung 14 Strom-Spannungskurven bezogen auf die Kapazität, gemessen an adrenalen NCI-H295R Zellen. Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H, $n=25$ für ATP und $n=30$ für GTP (schwarz), CACNA1H^{S475T/R788C}, $n=19$ für ATP und $n=35$ für GTP (orange), CACNA1H^{S475T} (blau) und CACNA1H^{R788C} (grün) transfizierten Zellen durchgeführt. Zu beachten ist, dass ein Teil der Messungen an CACNA1H^{S475T/R788C} mit ATP in der Pipettenlösung und der andere Teil mit zusätzlich GTP in der Pipettenlösung durchgeführt wurden. Diese Messungen werden getrennt voneinander dargestellt (siehe (D) und (E)). In (A) werden alle (unter ATP) untersuchten Gruppen dargestellt. In (B) – (E) wird der WT CACNA1H dann mit je einer Mutante verglichen. Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K⁺) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -90 mV bis +45 mV durchschritten. Während der Messung wird die Kapazität der Zelle mit aufgezeichnet. Für jede einzelne Messung wurden die Messwerte durch die Kapazität der jeweiligen Zelle dividiert, um so Unterschiede in der Stromhöhe durch die Zellgröße auszugleichen. Als Ergebnis wird hier die Stromdichte (Current Density) in [pA/pF] auf der Ordinate aufgetragen.

4.2.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung

Wie unter **1.4.2 Funktion** erklärt, können Calcium-Kanäle aktivieren und inaktivieren. Ob die Geschwindigkeit der Aktivierung bzw. Inaktivierung durch die Mutation(en) beeinflusst wird, wurde ebenfalls mittels Whole-Cell Patch Clamp Technik untersucht.

Aktivierung: In **Abbildung 15 (A)** werden alle Kanalentitäten miteinander verglichen. Anhand der Graphen ist zu erkennen, dass der WT CACNA1H im Vergleich zu CACNA1H^{S475T}, CACNA1H^{R788C} und CACNA1H^{S475T/R788C} bei -70 mV langsamer zu aktivieren scheint, siehe **Abbildung 15 (A)-(E)**. Oder andersherum ausgedrückt: Die mutationstragenden Kanäle zeigen bei -70 mV eine schnellere Aktivierung als der WT CACNA1H. Das ist bei CACNA1H^{S475T/R788C} im gesamten Spannungsbereich von -70 mV bis -20 mV, sowohl unter ATP als auch unter GTP, zu erkennen, siehe (D) und (E). Bei einem Spannungswert von ungefähr -60 mV dreht sich dieses Verhältnis in (B) und (C) um: CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} aktivieren langsamer als WT CACNA1H.

Ob diese Unterschiede signifikant sind, wurde mit einem multifaktoriellen ANOVA-Test untersucht. Gemäß diesem Test kann kein signifikanter Unterschied detektiert werden.

Inaktivierung: Bei -70 mV unter ATP scheinen die mutationstragenden Kanäle CACNA1H^{S375T}, CACNA1H^{R788C} und CACNA1H^{S475T/R788C} langsamer zu inaktivieren im Vergleich zum WT CACNA1H, siehe (A) – (D). Unter GTP kann dieser Effekt bei CACNA1H^{S475T/R788C} nicht bestätigt werden, siehe (E).

Ein multifaktorieller ANOVA-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

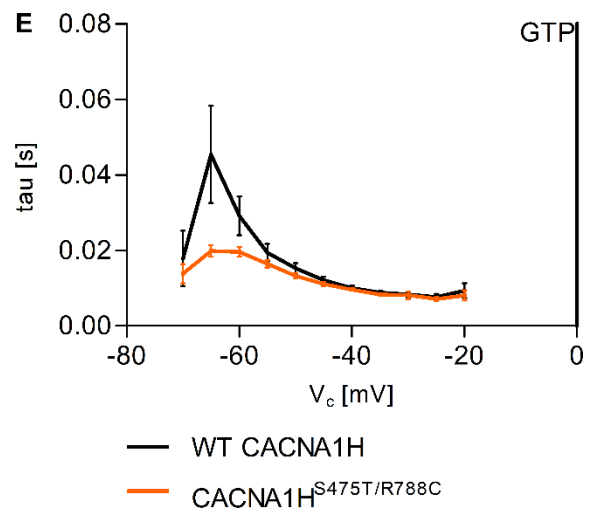
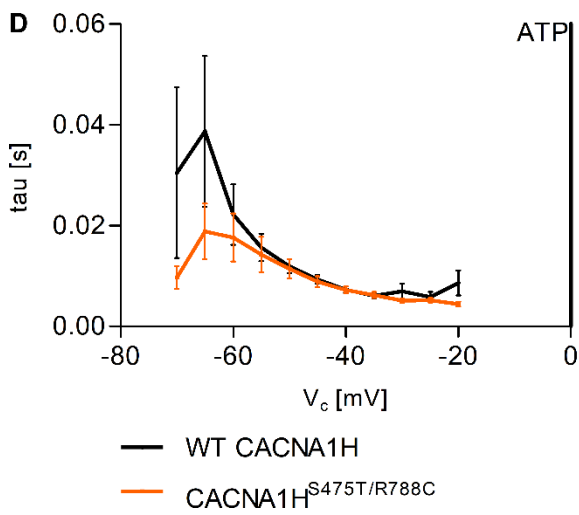
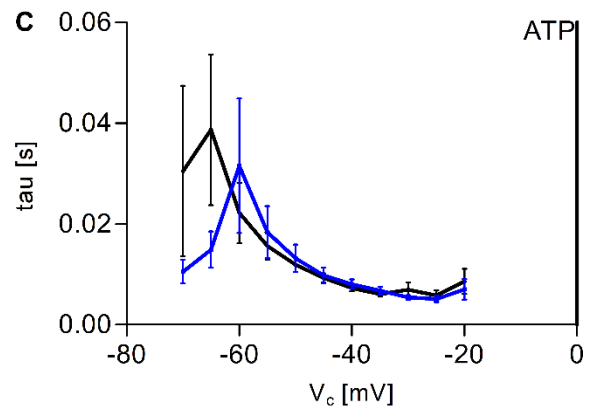
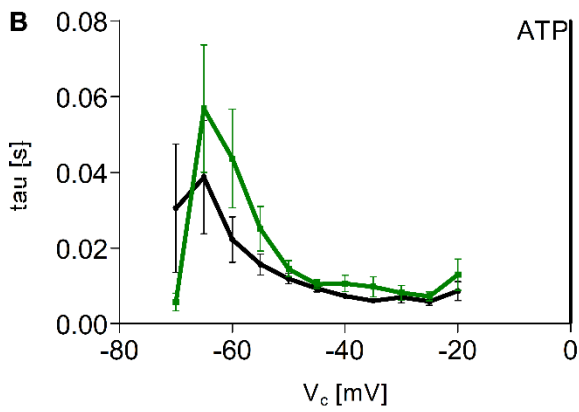
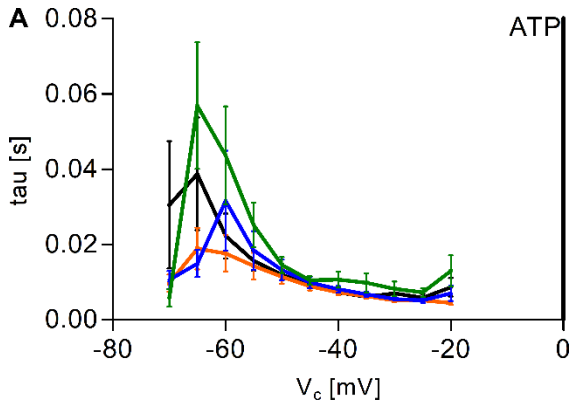


Abbildung 15 Kinetik der Aktivierung von WT CACNA1H, CACNA1H^{S475T/R788C}, CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C}, gemessen an transfizierten NCI-H295R Zellen. Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H, n=27 für ATP und n=29 für GTP (schwarz), CACNA1H^{S475T/R788C}, n=18 für ATP und n=34 für GTP (orange), CACNA1H^{S475T}, n=19 (blau) und CACNA1H^{R788C}, n=21 (grün) transfizierten Zellen durchgeführt. Zu beachten ist, dass ein Teil der Messungen an CACNA1H^{S475T/R788C} mit ATP in der Pipettenlösung und der andere Teil mit zusätzlich GTP in der Pipettenlösung durchgeführt wurden. Diese Messungen werden getrennt voneinander dargestellt (siehe (D) und (E)). In (A) werden alle (unter ATP) untersuchten Gruppen dargestellt. In (B) – (E) wird der WT CACNA1H dann mit je einer Mutante verglichen. Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K⁺) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -70 mV bis -20 mV durchschritten. Die Zeit der Aktivierung (in tau [ms]) wurde mittels einer exponentiellen Fitting-Funktion aus den Stromkurven ermittelt (Fit-Master v2x90.5 Software, Heka, Lambrecht, Deutschland).

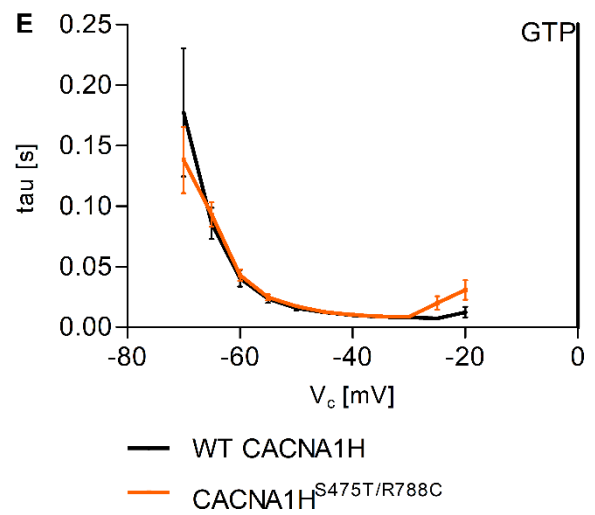
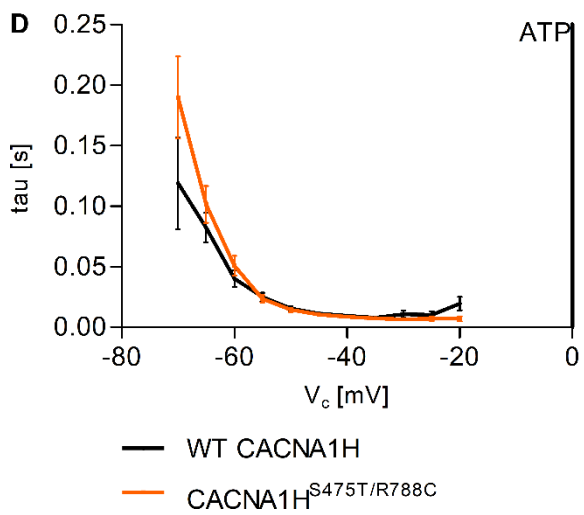
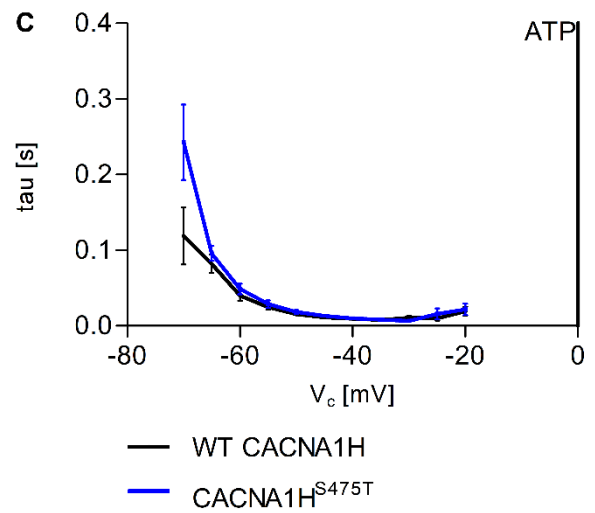
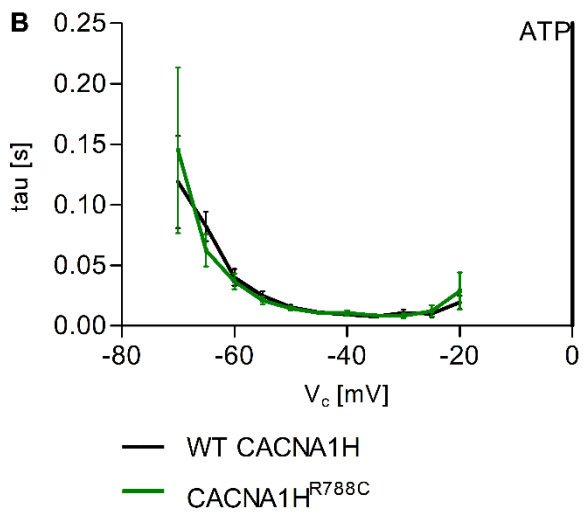
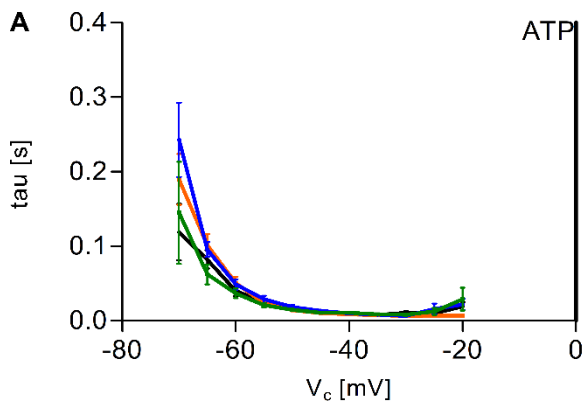


Abbildung 16 Kinetik der Inaktivierung von WT CACNA1H, CACNA1H^{S475T/R788C}, CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C}, gemessen an transfizierten NCI-H295R Zellen. Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H, n=27 für ATP und n= (schwarz), CACNA1H^{S475T/R788C}, n=18 für ATP und n= (orange), CACNA1H^{S475T}, n=19 (blau) und CACNA1H^{R788C}, n=21 (grün) transfizierten Zellen durchgeführt. Zu beachten ist, dass ein Teil der Messungen an CACNA1H^{S475T/R788C} mit ATP in der Pipettenlösung und der andere Teil mit zusätzlich GTP in der Pipettenlösung durchgeführt wurden. Diese Messungen werden getrennt voneinander dargestellt (siehe (D) und (E)). In (A) werden alle (unter ATP) untersuchten Gruppen dargestellt. In (B) – (E) wird der WT CACNA1H dann mit je einer Mutante verglichen. Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K⁺) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -70 mV bis -20 mV durchschritten. Die Zeit der Inaktivierung (in tau [ms]) wurde mittels einer exponentiellen Fitting-Funktion aus den Stromkurven ermittelt (Fit-Master v2x90.5 Software, Heka, Lambrecht, Deutschland).

4.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen unter Stimulation mit Angiotensin II an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden

Die Experimente, deren Ergebnisse in 4.2 dargestellt sind, wurden unter Kontrollbedingungen, das heißt ohne zusätzliche Stimulation, durchgeführt. Sie wurden unter Stimulation mit Ang II wiederholt, um die Effekte, die Ang II auf die Kanaleigenschaften des CACNA1H hat, zu untersuchen. Insbesondere sollte festgestellt werden, ob sich der stimulierende Effekt von Ang II unterschiedlich verhält zwischen WT CACNA1H und mutationstragenden CACNA1H.

Die folgenden Experimente wurden nur an mit WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C} transfizierten Zellen durchgeführt. Ebenso wurde für jedes Experiment neben ATP auch GTP als Zusatz in der Pipettenlösung verwendet, siehe **5. Diskussion**.

Es wurde Ang II in 500 pM und 10 nM verwendet, um zu prüfen, ob die Höhe der Ang II Konzentration mögliche Effekte weiter verstärkt. Zu beachten ist allerdings, dass die n-Zahlen im Allgemeinen gering ausfallen. Besonders bei den Experimenten mit Ang II = 10 nM ist die n-Zahl mit 3 bzw. 2 (zu) niedrig. Die durchgeführten Experimente werden als Vorexperimente gewertet und sind im Folgenden in dieser Arbeit aufgeführt.

4.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und dMUT CACNA1H^{S475T/R788C} unter Stimulation mit Ang II

Auf welche Weise sich Ang II auf die Strom-Spannungskurve auswirkt, wurde für WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C} untersucht, siehe **Abbildung 17**. In (A) werden die Effekte für den WT CACNA1H abgebildet, siehe **Abbildung 17 (A)**. Man erkennt, dass sich die Kurve zu negativeren Spannungen hin verschiebt. Der Maximalstrom wird beim WT CACNA1H unter Normalbedingungen bei -50 mV erreicht. Stimuliert mit Ang II liegt dieser bei circa -55 mV. Dieser Effekt wird durch die Erhöhung von Ang II von 500 pM auf 10 nM nur gering weiter verstärkt. Bei einem multifaktoriellen ANOVA Test wurden diese Unterschiede als nicht signifikant angezeigt.

In **Abbildung 17 (B)** sieht man die gleichen Messungen, durchgeführt an CACNA1H^{S475T/R788C}. Die Mutante zeigt unter Ang II ebenfalls eine Verschiebung der Strom-Spannungskurve hin zu negativeren Spannungen. Hier verschiebt sich das

Strommaximum sogar von -50 mV unter Normalbedingungen zu circa -60 mV. Eine Erhöhung von Ang II von 500 pM auf 10 nM verstärkt auch hier den Effekt nur gering.

Nach Durchführung eines multifaktoriellen ANOVA-Tests konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten festgestellt werden.

Auch bei den Stimulationsexperimenten wurde der Strom auf die Kapazität der Zelle bezogen, um Unterschiede in der Stromhöhe aufgrund der Zellgröße auszugleichen, siehe **Abbildung 18** (A) und (B).

Interessanterweise nahm die Stromhöhe nach Gabe von Ang II in diesen Experimenten ab. Das gilt sowohl für den WT CACNA1H, siehe (A), als auch für CACNA1H^{S475T/R788C}, siehe (B).

Zu beachten ist hierbei, dass die n-Zahl gering ausfällt, siehe **4.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen unter Stimulation mit Angiotensin II an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden**.

Ein multifaktorieller ANOVA konnte bei WT CACNA1H keine signifikanten Unterschiede in der Stromhöhe nach Stimulation nachweisen. Bei CACNA1H^{S475T/R788C} wurden mit dem multifaktoriellen ANOVA signifikante Unterschiede zwischen nicht stimulierten Zellen und Stimulation mit Ang II 10 nM errechnet. Diese Ergebnisse müssen hinsichtlich einer n-Zahl von 2 für die mit 10 nM Ang II stimulierten Zellen sehr kritisch gesehen werden. Um die Vollständigkeit zu gewährleisten, werden die Werte in einer Tabelle dargestellt und deren zugehörigen p-Werte angegeben.

Ein signifikanter Unterschied wurde bei folgenden Spannungswerten gefunden:

Tab. 1: Signifikante Unterschiede in den Strom-Spannungskurven bezogen auf die Kapazität, gemessen an adrenalen NCI-H295R Zellen mit CACNA1H^{S475T/R788C} unter Stimulation mit Ang II 10 nM verglichen mit basalen Bedingungen (nicht stimuliert, Ang II = 0 nM). Dabei gilt für CACNA1H^{S475T/R788C} nicht stimuliert n = 14 und CACNA1H^{S475T/R788C} 10 nM Ang II n = 3.

-90 mV	p = 0,02
-85 mV	p = 0,02
-70 mV	p = 0,04
-65 mV	p = 0,02
-60 mV	p = 0,02
-55 mV	p = 0,01
-50 mV	p = 0,01

-45 mV	$p = 0,01$
-40 mV	$p = 0,01$
-35 mV	$p = 0,01$
-30 mV	$p = 0,01$
-25 mV	$p = 0,03$
-5 mV	$p = 0,03$
0 mV	$p = 0,01$
5 mV	$p = 0,00$
10 mV	$p = 0,00$
15 mV	$p = 0,00$
20 mV	$p = 0,00$
25 mV	$p = 0,00$
30 mV	$p = 0,00$
35 mV	$p = 0,00$
40 mV	$p = 0,00$
45 mV	$p = 0,00$

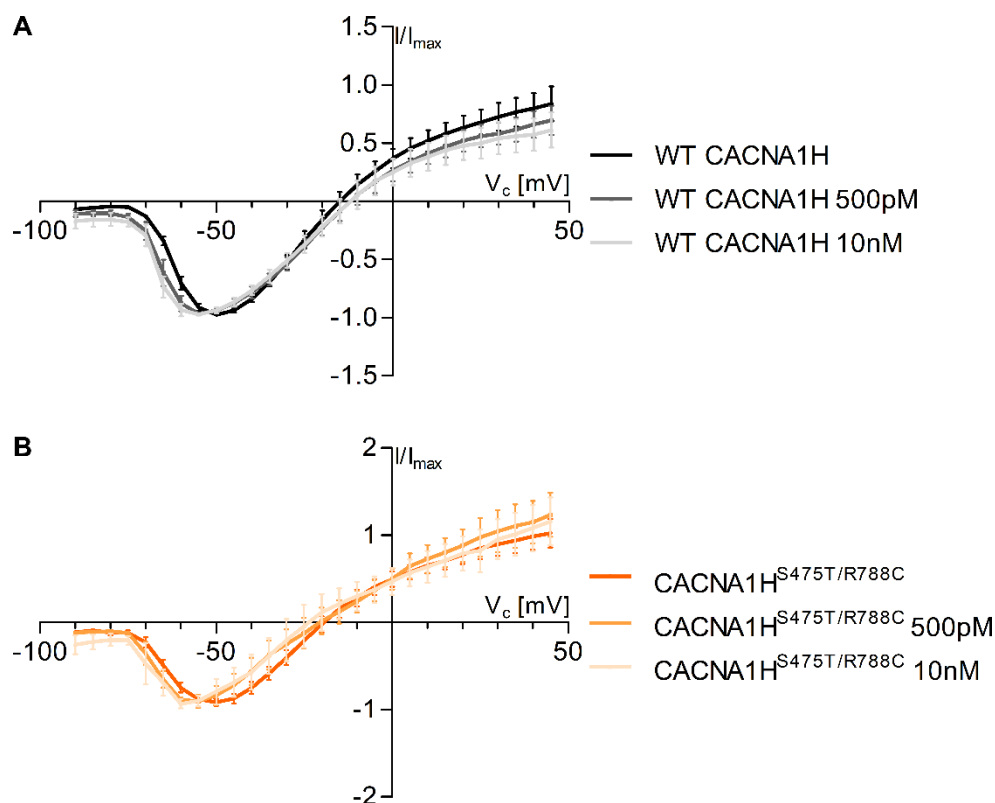


Abbildung 17 Strom-Spannungskurven relativiert auf den Peakstrom I_{max} , gemessen an adrenalen NCI-H295R Zellen unter Stimulation mit Ang II (500 pM und 10 nM). Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H (schwarz bis hellgrau) und CACNA1H^{S475T/R788C} (orange bis hellorange) transfizierten Zellen durchgeführt. WT nicht stimuliert mit $n=13$, WT 500 pM Ang II mit $n=8$ und WT 10 nM Ang II mit $n=6$. CACNA1H^{S475T/R788C} nicht stimuliert mit $n=14$, CACNA1H^{S475T/R788C} 500 pM Ang II mit $n=5$ und CACNA1H^{S475T/R788C} 10 nM Ang II mit $n=3$.

Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K^+) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -90 mV bis +45 mV durchschritten. Bei stabilen Verhältnissen wurde die Kontroll-Ringerlösung ersetzt durch eine Stimulationslösung mit zunächst 500 pM Ang II und dann 10 nM Ang II. Jeweils nach vollständigem Austausch der Badlösung wurde das Spannungsprotokoll wie oben beschrieben unter Stimulation aufgezeichnet.

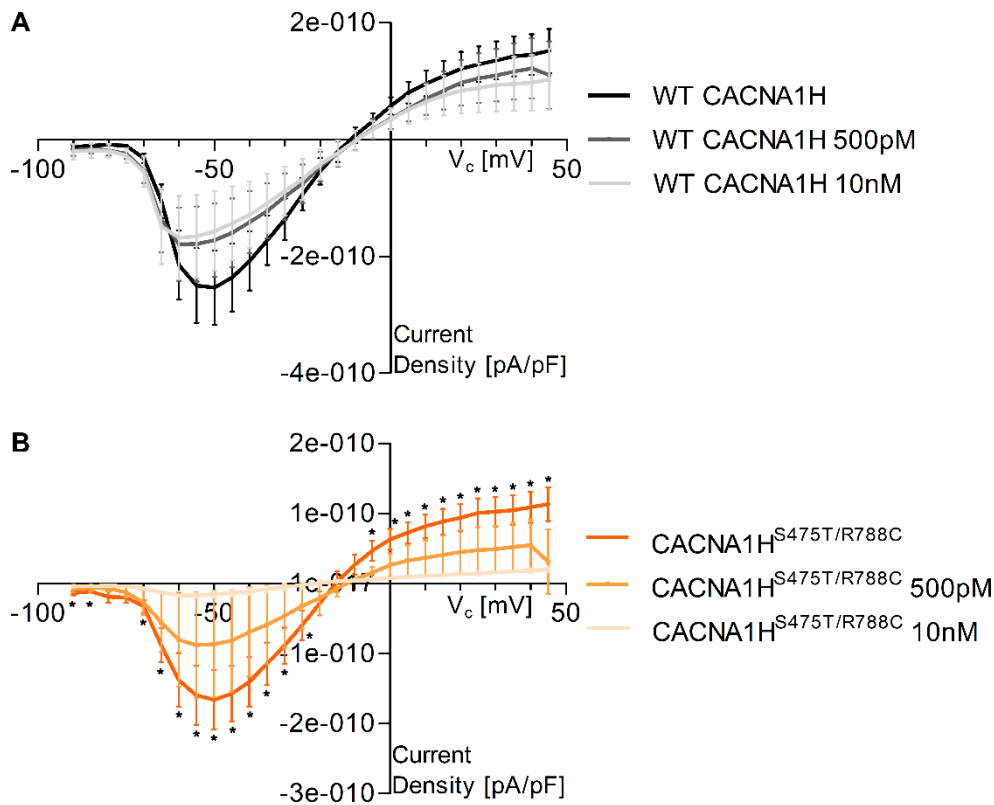


Abbildung 18 Strom-Spannungskurven bezogen auf die Kapazität, gemessen an adrenalen NCI-H295R Zellen unter Stimulation mit Ang II (500 pM und 10 nM). Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H (schwarz bis hellgrau) und CACNA1H^{S475T/R788C} (orange bis hellorange) transfizierten Zellen durchgeführt. WT nicht stimuliert mit n=13, WT 500 pM Ang II mit n=8 und WT 10 nM Ang II mit n=6. CACNA1H^{S475T/R788C} nicht stimuliert mit n=14, CACNA1H^{S475T/R788C} 500 pm Ang II mit n=5 und CACNA1H^{S475T/R788C} 10 nM Ang II mit n=3.

Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K⁺) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -90 mV bis +45 mV durchschritten. Während der Messung wird die Kapazität der Zelle mit aufgezeichnet. Bei stabilen Verhältnissen wurde die Kontroll-Ringerlösung ersetzt durch eine Stimulationslösung mit zunächst 500 pM Ang II und dann 10 nM Ang II. Jeweils nach vollständigem Austausch der Badlösung wurde das Spannungsprotokoll wie oben beschrieben unter Stimulation aufgezeichnet.

Signifikante Werte wurden mit einem * markiert.

4.3.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung unter Stimulation mit Ang II

Die Veränderungen der Kinetik des CACNA1H unter Stimulation mit Ang II (500 pM und 10 nM) wurden ebenfalls untersucht. Dafür wurden mit WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C} transfizierte Zellen verwendet.

Aktivierung: In **Abbildung 19** (A) und (B) wird die Aktivierung dargestellt. Man erkennt, dass unter Stimulation mit Ang II die Aktivierung bei Spannungswerten von -65 mV bis -55 mV bei WT CACNA1H langsamer abzulaufen scheint, siehe **Abbildung 19** (A). Für CACNA1H^{S475T/R788C} gilt das für den gesamten Spannungsbereich, siehe **Abbildung 19** (B). Die Unterschiede sind aber sowohl bei WT CACNA1H als auch CACNA1H^{S475T/R788C} gering ausgeprägt.

Eine Stimulationssteigerung von 500 pM Ang II auf 10 nM Ang II scheint dabei keinen großen Unterschied zu machen. Ein multifaktorieller ANOVA zeigt weder bei WT CACNA1H noch bei CACNA1H^{S475T/R788C} signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Inaktivierung: In **Abbildung 20** (A) und (B) wird die Inaktivierung dargestellt. Aus dem Verlauf der Graphen kann gefolgert werden, dass unter Stimulation mit Ang II die Inaktivierung sowohl beim WT CACNA1H (A) als auch bei CACNA1H^{S475T/R788C} (B) schneller abzulaufen scheint. Eine Steigerung der Ang II Konzentration von 500 pM auf 10 nM Ang II verstärkt diesen Effekt ausschließlich bei -70 mV weiter. Ein multifaktorieller ANOVA zeigt bei WT CACNA1H keine signifikanten Unterschiede. Bei CACNA1H^{S475T/R788C} kann ein signifikanter Unterschied bei -60 mV zwischen nicht stimuliert und Stimulation mit 10 nM Ang II festgestellt werden ($p = 0,04$). Hier muss bei der Interpretation die niedrige n-Zahl = 2 bei den Zellen mit Stimulation mit 10 nM Ang II beachtet werden.

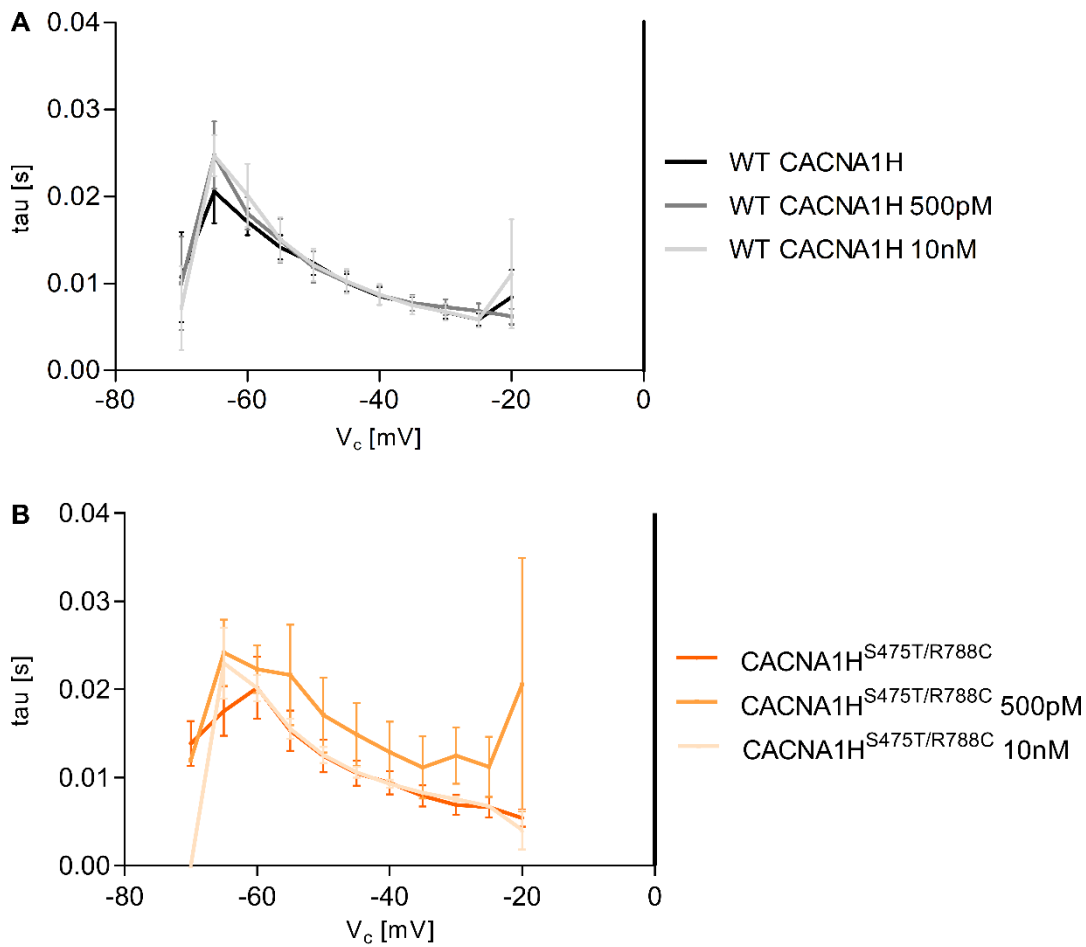


Abbildung 19 Kinetik der Aktivierung von WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C}, gemessen an transfizierten NCI-H295R Zellen unter Stimulation mit Ang II (500 pM und 10 nM). Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H (schwarz bis hellgrau) und CACNA1H^{S475T/R788C} (orange bis hellorange) transfizierten Zellen durchgeführt. WT nicht stimuliert mit $n=13$, WT 500 pM Ang II mit $n=8$ und WT 10 nM Ang II mit $n=6$. CACNA1H^{S475T/R788C} nicht stimuliert mit $n=14$, CACNA1H^{S475T/R788C} 500 pM Ang II mit $n=5$ und CACNA1H^{S475T/R788C} 10 nM Ang II mit $n=2$.

Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K^+) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -70 mV bis -20 mV durchschritten. Die Zeit der Aktivierung (in τ [ms]) wurde mittels einer exponentiellen Fitting-Funktion aus den Stromkurven ermittelt (Fit-Master v2x90.5 Software, Heka, Lambrecht, Deutschland). Bei stabilen Verhältnissen wurde die Kontroll-Ringerlösung durch eine Stimulationslösung mit zunächst 500 pM Ang II und im Anschluss 10 nM Ang II ersetzt. Jeweils nach vollständigem Austausch der Badlösung wurde das Spannungsprotokoll wie oben beschrieben unter Stimulation aufgezeichnet.

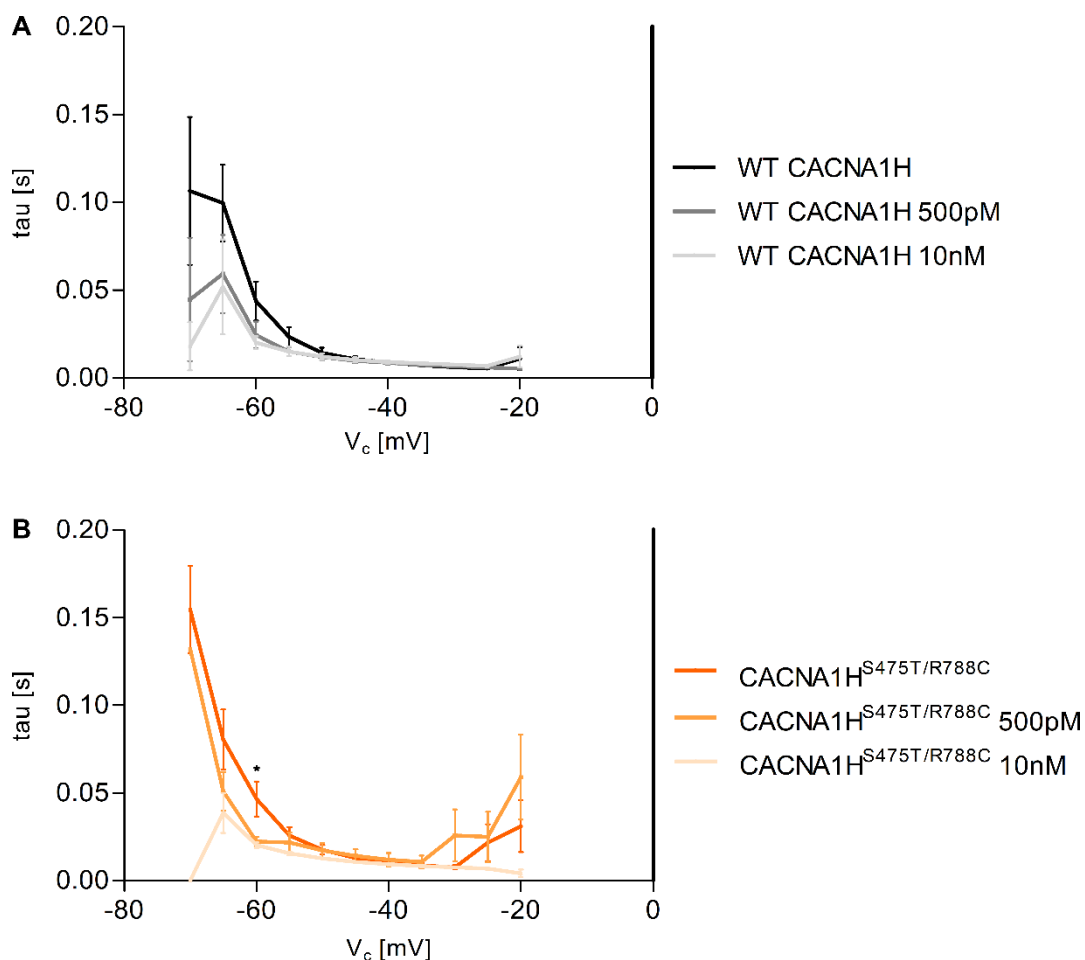


Abbildung 20 Kinetik der Inaktivierung von WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C}, gemessen an transfizierten NCI-H295R Zellen unter Stimulation mit Ang II (500 pM und 10 nM). Die Messungen wurden an mit WT CACNA1H (schwarz bis hellgrau) und CACNA1H^{S475T/R788C} (orange bis hellorange) transfizierten Zellen durchgeführt. WT nicht stimuliert mit n=13, WT 500 pM Ang II mit n=8 und WT 10 nM Ang II mit n=6. CACNA1H^{S475T/R788C} nicht stimuliert mit n=14, CACNA1H^{S475T/R788C} 500 pM Ang II mit n=5 und CACNA1H^{S475T/R788C} 10 nM Ang II mit n=2.

Die transienten Einwärtsströme wurden mit der Whole-Cell Patch Clamp Methode gemessen. Die Zellen wurden während der Messung mit Kontroll-Ringerlösung (3,6 mM K⁺) umspült und auf -100 mV geklemmt. Das Spannungsprotokoll wurde in 5 mV Schritten von -70 mV bis -20 mV durchschritten. Die Zeit der Aktivierung (in tau [ms]) wurde mittels einer exponentiellen Fitting-Funktion aus den Stromkurven ermittelt (Fit-Master v2x90.5 Software, Heka, Lambrecht, Deutschland). Bei stabilen Verhältnissen wurde die Kontroll-Ringerlösung durch eine Stimulationslösung mit zunächst 500 pM Ang II und im Anschluss 10 nM Ang II ersetzt. Jeweils nach vollständigem Austausch der Badlösung wurde das Spannungsprotokoll wie oben beschrieben unter Stimulation aufgezeichnet.

Signifikante Werte wurden mit einem * markiert.

5. Diskussion

Im Folgenden werden die, unter **4. Ergebnisse** dargestellten, Resultate diskutiert. Die neugewonnenen Ergebnisse werden dafür auch mit Ergebnissen aus anderen Arbeiten verglichen. Es werden in der Diskussion Vorschläge gemacht, welche Experimente im Anschluss durchgeführt werden können, um die Mutationen und ihren Einfluss auf die Funktion des CACNA1H weiter zu untersuchen. Letztlich wird in der Diskussion die Frage aufgegriffen, ob es wahrscheinlich ist, dass die untersuchten Mutationen einen Einfluss auf die Entstehung eines Primären Hyperaldosteronismus haben.

Bevor die Ergebnisse diskutiert werden, wird darauf eingegangen, wieso Pipettenlösungen mit ATP bzw. mit ATP und GTP verwendet wurden. ATP und GTP sind Energieträger und werden bei vielen unterschiedlichen Prozessen in der Zelle benötigt, wobei GTP vor allem für seine Funktion im Zusammenhang mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren wichtig ist. In dieser Arbeit wurden Experimente ohne Stimulation und unter Stimulation mit Ang II durchgeführt. In einem Paper von McCarthy et al. wurde berichtet, dass für den Einfluss von Ang II auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des CACNA1H GTP benötigt wird (McCarthy, Richard, T. et al. 1993).

Die Experimente unter **4.2 Whole-Cell Patch Clamp Messungen an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden** wurden unter Kontrollbedingungen, daher ohne Stimulation mit Ang II, durchgeführt. Hier wurde zunächst für die erste Serie an Experimenten ausschließlich ATP in der Pipettenlösung verwendet. Anschließend sollte in einer zweiten Serie der Einfluss von Ang II untersucht werden, dargestellt unter **4.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen unter Stimulation mit Angiotensin II an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden**. Da, wie oben erwähnt, GTP für die Wirkung von Ang II essentiell ist (McCarthy, Richard, T. et al. 1993), wurden diese Experimente mit

zusätzlich GTP in der Pipettenlösung durchgeführt. Allerdings wurden auch hier Zellen ohne Stimulation mit Ang II gemessen, diese fungierten als Kontrollgruppe.

Daraus ergeben sich für die in 4.2 dargestellten Ergebnisse unter Kontrollbedingungen, sowohl Messungen, die nur ATP in der Pipettenlösung hatten, als auch Messungen, bei denen GTP hinzugefügt wurde. Sie wurden jedoch getrennt in den Diagrammen dargestellt.

5.1 Expression des Gens CYP11B2 in adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid und Mutation(en) tragenden Plasmiden

Wie in der Einleitung erklärt, kodiert CYP11B2 für die Aldosteronsynthese, das Enzym, das den letzten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Aldosteronsynthese katalysiert (Bassett et al. 2004), siehe unter **1.3 Wirkmechanismus von Angiotensin II**. Eine vermehrte Expression dieses Enzyms hat folglich eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron zur Folge. Mittels Realtime-PCR sollte untersucht werden, ob Zellen, die mit CACNA1H^{S475T}, CACNA1H^{R788C} oder CACNA1H^{S475T/R788C} transfiziert wurden im Vergleich zum WT CACNA1H eine veränderte Expression von CYP11B2 aufweisen. Für die in der Einleitung vorgestellte Mutation CACNA1H^{M1549V} konnte in (Reimer et al. 2016) eine signifikante Erhöhung der Expression um das 7fache von CYP11B2 im Vergleich zu WT CACNA1H nachgewiesen werden, siehe **1.5.1 Beschriebene Mutationen des CACNA1H**. Es wurde geprüft, ob diese Ergebnisse auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten reproduziert werden können. Aus diesem Grund wurde die Realtime – PCR auch mit CACNA1H^{M1549V} durchgeführt.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, dargestellt in **4.1 Expression des Gens CYP11B2 in adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid und Mutation(en) tragenden Plasmiden**, so lässt sich erkennen, dass bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte CYP11B2 Expression nachgewiesen werden konnte, diese aber nicht signifikant erhöht war. Das gilt in diesem Experiment auch für CACNA1H^{M1549V}. Im Vergleich zum WT CACNA1H kann hier lediglich eine 2fach erhöhte Expression nachgewiesen werden.

Mögliche Einflussfaktoren, die zu den Unterschieden führten, werden nun diskutiert:

Zunächst wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet (In Reimer et al. HAC 15 Zellen, in dieser Arbeit Zellen der Nebennieren-Zelllinie NCI-H295R) und auf ein anderes Haushaltsgen relativiert (In Reimer et al. GAPDH, in dieser Arbeit β -Aktin). Des Weiteren wurden andere Plasmide verwendet (In Reimer et al. pCMV6-AC-IRES-GFP-Puro, hier pIRES-CD8-Plasmid).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde für jede Gruppe eine n-Zahl von 6 erreicht. Diese sollte durch Wiederholungen des Experiments erhöht werden. Hinzukommend ist zu erwähnen, dass die Transfektionsrate bei diesen Experimenten kleiner als 20% war. Das führt zu einem geringeren Anteil an tatsächlich mutationstragenden Zellen an allen gemessenen Zellen, was zur Folge hat, dass (kleine) Effekte noch schwieriger nachzuweisen sind. In anschließenden Experimenten sollte deshalb versucht werden, das Transfektionsprotokoll (weiter) zu optimieren. Dafür können beispielsweise unterschiedliche Pulsprotokolle bei der Elektroporation verwendet und miteinander verglichen werden oder die Inkubationszeit angepasst werden.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der Transfektionseffizienz aus dem Experiment zu nehmen, ist, vor der Realtime-PCR die Zellen, bei der die Transfektion erfolgreich war, von den anderen Zellen abzutrennen. Bei der Transfektion wird über das Plasmid neben der genetischen Information für CACNA1H auch die Information für CD8 in die Zelle eingebracht. Das Oberflächenprotein CD8 soll magnetische Eigenschaften aufweisen. Über ein Verfahren, in welchem mit einem Magneten gearbeitet wird, könnte man so die transfizierten Zellen abtrennen und speziell nur an diesen die Realtime-PCR durchführen. Die Transfektionsrate als Einflussfaktor würde mit diesem Verfahren in der Beurteilung der Ergebnisse vernachlässigt werden können.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass mit der Realtime-PCR zwar leichte, aber keine signifikanten Unterschiede in der CYP11B2 Expression zwischen mutierten CACNA1H und WT CACNA1H nachzuweisen waren. Der in anderen Arbeiten beschriebene deutlich signifikante Effekt der CACNA1H^{M1549V} Mutation auf die CYP11B2 Expression, konnte hier, vermutlich wegen der schlechteren Transfektionseffizienz, nicht repliziert werden. Man kann also spekulieren, dass die hier untersuchten Mutationen CACNA1H^{S475T}, CACNA1H^{R788C} und CACNA1H^{S475T/R788C} auch einen stärkeren Effekt auf die CYP11B2 Expression haben, als anhand dieser Ergebnisse zu deuten ist. Allerdings wird dieser Effekt wahrscheinlich geringer ausfallen als der von CACNA1H^{M1549V}. Das Experiment sollte

also nach Optimierung des Protokolls, insbesondere der Erhöhung der Transfektionseffizienz, wiederholt werden.

5.2 Whole-Cell Patch Clamp Messungen an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden

Während die Transfektionseffizienz bei der Realtime-PCR einen großen Einfluss hat, kann sie bei den im folgenden diskutierten Patch Clamp Messungen vernachlässigt werden. Das ist darin begründet, dass die, bei der Transfektion verwendeten Plasmide auch die genetische Sequenz für CD8, ein Oberflächenprotein, tragen, siehe **3.2.2 Transiente Transfektion-Elektroporation** und **3.2.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen**. An dieses können sogenannte Dynabeads binden, welche dann erfolgreich transfizierte Zellen markieren. Diese Zellen werden gezielt für die Patch Clamp Messungen ausgewählt.

Mit der Whole-Cell Patch Clamp Technik wurden Strom-Spannungskurven gemessen und Aktivierung und Inaktivierung des CACNA1H aufgenommen. Im Folgenden werden die, unter **4.2 Whole-Cell Patch Clamp Messungen an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden** dargestellten, Ergebnisse diskutiert.

5.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und Mutation(en)-tragendem CACNA1H

Unter **4.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und Mutation(en)-tragendem CACNA1H** wurden die Strom-Spannungskurven für die unterschiedlich transfizierten Zellen abgebildet.

Bei anderen Mutationen im CACNA1H, wie beispielsweise der CACNA1H^{M1549V} wurde herausgefunden, dass die Mutation die Strom-Spannungskurve des Kanals zu negativeren Spannungswerten hin verschiebt. Das bedeutet, dass der CACNA1H^{M1549V} bereits bei Spannungswerten einen Ca²⁺-Einwärtsstrom aufweist, bei denen der WT CACNA1H noch nicht aktiviert ist und auch, dass das Strommaximum

von CACNA1H^{M1549V} bei einem negativeren Spannungswert liegt als das von WT CACNA1H, siehe **Abbildung 1** (Gürtler et al. 2020). Durch den vermehrten Ca²⁺ - Einstrom können CaMK und infolgedessen Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Daraus kann eine vermehrte Transkription von CYP11B2 resultieren, was eine vermehrte Aldosteronproduktion und -ausschüttung bedingt.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls untersucht, wie sich die bei der Patientin von Dr. Kroiß nachgewiesenen Mutationen CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} auf elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals auswirken. Da sich die Kombination zweier Mutation gegenseitig verstärken kann (Vitko et al. 2005), wurde hier auch der Genotyp CACNA1H^{S475T/R788C} untersucht. Wie in **Abbildung 13** zu erkennen ist, sieht man hier lediglich bei CACNA1H^{S475T/R788C} in der Serie mit ATP-haltiger Pipettenlösung (ohne GTP) (D) eine leichte Veränderung im Verlauf der Kurve im Vergleich zum WT CACNA1H. Tatsächlich handelt es sich hierbei aber um eine sehr leichte Verschiebung hin zu positiveren Werten, entgegengesetzt zu dem, was für die Mutation CACNA1H^{M1549V} beschrieben wurde. Folglich würde das bedeuten, dass CACNA1H^{S475T/R788C} erst bei einer stärkeren Depolarisation der Nebennierenzellen aktiviert wird und dementsprechend eine geringere Stimulierbarkeit der CYP11B2-Expression zu vermuten ist. Verfolgt man diesen Gedanken, dann hätte das eine niedrigere Aldosteron Ausschüttung zur Folge. Es liegen allerdings keine signifikanten Unterschiede vor, weshalb dieser Effekt wahrscheinlich keine großen Auswirkungen haben dürfte.

Für die mutationstragenden Gruppen CACNA1H^{S475T}, CACNA1H^{R788C} und CACNA1H^{S475T/R788C} mit GTP zusätzlich in der Pipettenlösung sieht man keine Verschiebung der Kurve (siehe **Abbildung 13** (B), (C), (E)).

Zusätzlich wurde die Zellgröße der gemessenen Zellen berücksichtigt, in dem man den Strom durch die Kapazität der jeweiligen Zelle geteilt hat.

Die Vor-Überlegungen dazu waren, dass ein größerer Strom in einer höheren Aldosteronproduktion resultieren könnte. Aus **Abbildung 14** (D) und (E) zu schließen kann das der Fall bei CACNA1H^{S475T/R788C} sein, da diese mutationstragenden Zellen einen im Vergleich zum WT CACNA1H vergrößerten Strom zeigen (unter ATP ist dieser Effekt stärker ausgeprägt als unter GTP). Da jedoch keine signifikanten

Unterschiede zwischen mutationstragenden CACNA1H und WT CACNA1H gefunden werden konnten, sprechen die Ergebnisse dafür, dass kaum ein Unterschied in der Stromhöhe gemessen auf die Zellgröße besteht. Die Vermutung, dass die hier untersuchten Mutationen Auswirkungen auf die Aldosteronproduktion durch Veränderungen der Stromhöhe haben könnten, ist deshalb als unwahrscheinlich einzustufen.

Zusätzlich nahm die Stromdichte im Vergleich zum WT CACNA1H bei CACNA1H^{S475T} ab, siehe **Abbildung 14** (C). Es kann die Vermutung aufgestellt werden, dass CACNA1H^{S475T}, verglichen zu WT CACNA1H, einen geringeren Ca²⁺-Einstrom in die Zelle aufweist. Es wäre möglich, dass die Mutation S475T das Gating Break stabilisiert und damit den Ca²⁺-Einstrom behindert bzw. verlangsamt. Unter **4.2.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung** sieht man, dass CACNA1H^{S475T} ab -60 mV zu einer langsameren Aktivierung führt, was sich mit der geringeren Stromdichte deckt, siehe **5.2.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung**.

Andererseits ist nicht nur die Stromdichte ausschlaggebend für die Höhe des Ca²⁺-Einstroms, sondern auch, wie lange der Kanal potenziell für Ca²⁺ offenbleibt. Dafür muss zusätzlich neben der Aktivierung und Inaktivierung auch die Zeit der Deaktivierung bestimmt werden. Das wurde in dieser Arbeit aufgrund des Umfangs nicht realisiert, zur Erklärung der Deaktivierung siehe **1.4.2 Funktion**. Neben der Deaktivierung sind auch Ca²⁺-Messungen wichtig, welche aber ebenfalls den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschritten hätten.

5.2.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung

In **Abbildung 15** wurde die Aktivierung des WT CACNA1H mit mutationstragenden CACNA1H verglichen. Alle mutationstragenden CACNA1H zeigen bei Werten zwischen -70 mV bis -60 mV eine Tendenz zu schnellerer Aktivierung als der WT CACNA1H, siehe **Abbildung 15** (A) – (E). Ab -60 mV dreht sich dieses Verhältnis bei CACNA1H^{R788C} und CACNA1H^{S475T} um und sie scheinen langsamer als der WT CACNA1H zu aktivieren, siehe **Abbildung 15** (B) und (C). CACNA1H^{S475T/R788C}

tendiert über die gesamte Messung zu einer schnelleren oder ähnlich schnellen Aktivierung wie der WT CACNA1H, siehe **Abbildung 15** (D) und (E).

Zusätzlich scheinen die mutationstragenden Kanäle langsamer zu inaktivieren als der WT CACNA1H (mit Ausnahme CACNA1H^{S475T/R788C} mit GTP in der Pipettenlösung. Hier läuft die Inaktivierung bei -70 mV tendenziell schneller ab als beim WT CACNA1H, für alle anderen Spannungswerte sind die Graphen fast deckungsgleich), siehe **Abbildung 16** (A) – (E).

Da auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten, können allerdings nur Vermutungen aufgestellt werden:

Zusammengefasst kann man aus diesen Messungen also folgern, dass die mutationstragenden Kanäle insgesamt länger geöffnet sind als WT CACNA1H (mit Ausnahme von CACNA1H^{S475T/R788C} mit GTP in der Pipettenlösung). Anhand dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass dies in einem größeren Ca²⁺ - Einstrom resultiert. Das aber konnte in den davor durchgeführten Experimenten und in den in **5.2.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und Mutation(en)-tragendem CACNA1H** besprochenen Ergebnissen nur bedingt nachgewiesen werden. Lediglich CACNA1H^{S475T/R788C} zeigt in der Serie mit ATP-haltiger Pipettenlösung (ohne GTP) einen im Vergleich zum WT CACNA1H vergrößerten Strom, siehe **Abbildung 13** und 5.2.1. CACNA1H^{S475T} zeigt widersprüchlich einen verringerten Strom und CACNA1H^{R788C} unterscheidet sich hinsichtlich der Stromhöhe nicht von WT CACNA1H. Es besteht die Möglichkeit, dass trotz Veränderung der Kinetik bei CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C}, die Kombination beider als CACNA1H^{S475T/R788C} notwendig ist, um den Effekt des vermehrten Ca²⁺-Einstroms und damit eine erhöhte Aldosteron Ausschüttung zu sehen.

Um die möglichen Effekte verschiedener Mutationen auf die Ca²⁺-Aktivität zu bestimmen, sollen in nachfolgenden Arbeiten auch Ca²⁺-Messungen mittels Fura2 durchgeführt werden. Dafür war im Rahmen dieser Arbeit aber leider keine Zeit mehr. Zur Fortsetzung dieses Projekts bieten sich diese Messungen im Anschluss an.

5.3 Whole-Cell Patch Clamp Messungen unter Stimulation mit Angiotensin II an adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid bzw. Mutation(en) tragenden Plasmiden

Transfizierte Zellen wurden mit 500 pM und 10 nM Ang II stimuliert und deren Strom-Spannungskurven aufgezeichnet, sowie Aktivierung und Inaktivierung berechnet.

5.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C} unter Stimulation mit Ang II

Wie in der Einleitung unter **1.3 Wirkmechanismus von Angiotensin II** dargestellt führt Ang II zu einem vermehrten Ca²⁺-Einstrom und erhöht damit die Aldosteronproduktion. Dieser vermehrte Ca²⁺-Einstrom wird durch spannungsaktivierte Calciumkanäle in der Zellmembran verursacht. Dazu zählt auch der CACNA1H. Deshalb wurde mit diesen Experimenten untersucht, wie sich der CACNA1H unter Stimulation mit Ang II verhält. In dieser Arbeit wurden WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C} miteinander verglichen.

In **Abbildung 17 (A)** ist zu erkennen, dass sich die Strom-Spannungskurve des WT CACNA1H unter Ang II zu negativeren Spannungswerten verschiebt. Das bedeutet, dass der Kanal bereits bei Werten näher am Ruhepotential einen Ca²⁺-Einstrom zeigt. Dieses Ergebnis bestätigt die Wirkung von Ang II auf die Aktivität des CACNA1H. Bei diesen Unterschieden konnte aber keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Dieselbe Tendenz kann auch bei CACNA1H^{S475T/R788C} in **Abbildung 17 (B)** dargestellt werden. Ang II verschiebt die Strom-Spannungskurve hin zu negativeren Spannungswerten. Das Strommaximum verschiebt sich folglich ebenfalls in Richtung Ruhepotential.

Man erkennt, dass bereits 500 pM Ang II diesen Effekt haben und eine Steigerung auf 10 nM nur zu einer geringen weiteren Verstärkung führen. Physiologisch werden 10 nM Ang II im Blutplasma nicht erreicht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Cav-Kanal CACNA1H durch Ang II sensitiver gegenüber Depolarisationen wird. Es kann die Vermutung aufgestellt werden, dass dies auch in einem erhöhten Ca²⁺-Strom resultiert, doch tatsächlich konnte hier das Gegenteil beobachtet werden:

In **Abbildung 18** zeigt sich, dass mit Ang II die Stromdichte abnimmt. Das ist sowohl für den WT CACNA1H (Abb. 18 (A)) als auch für CACNA1H^{S475T/R788C} (Abb. 18 (B)) der

Fall. Bereits in früheren Arbeiten wurden diese inhibitorischen Effekte von Ang II auf die Stromstärke beschrieben. (Rossier et al. 1995) zeigen in ihrem Paper, eine Abnahme der Stromstärke nach Applikation von 50 nM Ang II. Die Experimente hier wurden allerdings an einer anderen Zelllinie durchgeführt und es wurden mittels der Patch Clamp Technik Ba^{2+} -Ströme statt Ca^{2+} -Ströme gemessen. Zusätzlich wurden die Experimente nicht an einem spezifischen T-Typ Ca_v -Kanal durchgeführt, sondern es wurde auf „alle“ in den Zellen vorkommenden T-Typ Ca_v -Kanäle geschlossen (Rossier et al. 1995). Nichtsdestotrotz wurde auch hier ein inhibitorischer Effekt beschrieben. (Rossier et al. 1995) ergänzten ihre Experimente sogar durch intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen, welche eine Abnahme in der Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation mit Ang II zeigen konnten. In (Rossier 2016) spekuliert der Autor, dass verschiedene Isoformen der T-Typ Ca_v -Kanäle unterschiedliche und gegenteilige Effekte auf die Aldosteron Produktion haben.

Für die Mutation $CACNA1H^{M1549V}$ wurde allerdings beobachtet, dass die Aldosteronproduktion bereits unter basalen Bedingungen um den Faktor 3,7 im Vergleich zum WT $CACNA1H$ zunimmt (Reimer et al. 2016). Betrachtet man die Ergebnisse unter **5.1 Expression des Gens CYP11B2 in adrenalen NCI-H295R-Zellen nach Transfektion mit WT-CACNA1H Plasmid und Mutation(en) tragenden Plasmiden**, scheinen die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen dagegen keinen solchen starken Effekt zu haben. Sie scheinen auch die Wirkung von Ang II auf den $CACNA1H$ nicht zu verändern, da sowohl der WT $CACNA1H$ als auch $CACNA1H^{S475T/R788C}$ in ähnlicher Weise reagieren.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss auch an die Durchführung des Experiments gedacht werden. Mit der Dauer des Experiments kann der Zugang zu der Zelle schlechter werden, sodass der Strom nicht mehr akkurat gemessen wird. Dies würde folglich dazu führen, dass die Ströme geringer angezeigt werden, als sie tatsächlich sind. Ein weiterer Punkt ist die geringe n-Zahl. Sie ist mit 13 für WT $CACNA1H$ und 14 für $CACNA1H^{S475T/R788C}$ unter Normalbedingungen, 8 für WT $CACNA1H$ und 5 für $CACNA1H^{S475T/R788C}$ unter 500 pM Ang II und 6 für WT $CACNA1H$ und 3 für $CACNA1H^{S475T/R788C}$ unter 10 nM Ang II nicht aussagekräftig genug. Man erkennt, dass die Streuung sehr groß ist. Die Experimente müssen bei Fortsetzung des Projekts wiederholt werden, um die n-Zahl zu vergrößern und so aussagekräftige Ergebnisse ableiten zu können.

Dennoch konnte beobachtet werden, dass der CACNA1H auf eine Stimulation mit Ang II reagiert und damit wahrscheinlich an der Wirkung von Ang II auf die Aldosteronproduktion beteiligt ist.

5.3.2 Kinetik des WT CACNA1H im Vergleich zu mutierten CACNA1H – Aktivierung und Inaktivierung unter Stimulation mit Ang II

In **Abbildung 19** und **Abbildung 20** wird die Kinetik von WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C} unter Stimulation mit Ang II miteinander verglichen.

Sowohl WT CACNA1H als auch CACNA1H^{S475T/R788C} scheinen unter Ang II langsamer zu aktivieren und gleichzeitig schneller zu inaktivieren, siehe **Abbildung 19** (A) und (B) und **Abbildung 20** (A) und (B). Daraus kann man folgern, dass Ang II dazu führt, dass die Zeit in der CACNA1H offen ist, verkürzt wird. Das deckt sich mit den Ergebnissen aus **Abbildung 18** bei denen die Stromhöhe bei Stimulation mit Ang II abnahm, siehe auch **5.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und CACNA1HS475T/R788C unter Stimulation mit Ang II.**

Wie unter **5.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von WT-CACNA1H und CACNA1HS475T/R788C unter Stimulation mit Ang II** erwähnt, müssen die Ergebnisse hinsichtlich der Einschränkungen der n-Zahl betrachtet werden. Auch diese Experimente sollten wiederholt werden.

Man kann aber auch hier anhand der Ergebnisse die Vermutungen aufstellen, dass der CACNA1H bei Stimulation mit Ang II einen inhibitorischen Effekt auf die Ca²⁺-Konzentration und damit die Aldosteronproduktion hat. Eine verkürzte Offenzeit ist vereinbar mit einer wie in 5.3.1 diskutierten verminderten Stromstärke.

5.4 Oszillationen

In diesem Unterpunkt soll kurz auf ein Thema eingegangen werden, welches in dieser Doktorarbeit nur angerissen wurde, aber immer mehr in den Fokus der Forschung zum Primären Hyperaldosteronismus gerät: Oszillationen, also spontane Entladungen über die Plasmamembran ähnlich Aktionspotentialen, in Zona Glomerulosa Zellen und ihre Rolle bei der Steuerung der Aldosteron Produktion. Der Gedanke dahinter ist, dass

durch Oszillationen vermehrt Ca^{2+} in die Zelle einströmt und auf diese Weise die Aldosteronproduktion vermehrt werden kann.

Ob Zona Glomerulosa Zellen allerdings selbst Aktionspotentiale generieren können, ist umstritten (Rossier 2016). Während bisher bei isolierten Zona Glomerulosa Zellen keine Oszillationen nachgewiesen werden konnten, konnten in Nebennierenrindenschnitten von Mäusen, in welchen noch Zell-Zell-Kontakte zwischen den ZG Zellen bestanden, Oszillationen über die Zellmembran detektiert werden (Hu et al. 2012). In dieser Arbeit wird auch beschrieben, dass der CACNA1H bei der Generation dieser Oszillationen eine entscheidende Rolle spielt (Hu et al. 2012).

In (Gürtler et al. 2020) wurden ebenfalls Oszillationen bei *isolierten* NCI-H295R-Zellen detektiert. Dabei zeigte die Mutante CACNA1H^{M1549V} im Vergleich zum WT CACNA1H vermehrte Oszillationen.

In dieser medizinischen Doktorarbeit wurden sporadisch auch Oszillationen in den Experimenten gesehen, allerdings gab es kein regelhaftes Auftreten und auch keine Unterschiede in der Häufigkeit zwischen WT CACNA1H und CACNA1H^{S475T/R788C}, weshalb sie in dieser Arbeit nicht extra ausgewertet und im Ergebnisteil dargestellt werden. Für zukünftige Experimente könnte genauer untersucht werden, unter welchen Umständen die Oszillationen (vermehrt) auftreten und ob eine Stimulation mit Ang II einen Effekt hat.

5.5 Einschätzung bezüglich der Krankheitsrelevanz der untersuchten Mutationen

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde PD Bandulik auf die hier untersuchten Mutationen CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} über den Kontakt mit dem Endokrinologen Matthias Kroiß aus Würzburg aufmerksam gemacht. Dieser betreut eine Patientin mit Hyperaldosteronismus, bei welcher die oben genannten Mutationen nachgewiesen werden konnten. Leider wurde nicht unterschieden, ob diese Mutationen auf einem Allel liegen oder nicht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Kombination CACNA1H^{S475T/R788C} sowie die Einzelmutanten CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} untersucht.

Diese Arbeit liefert Ergebnisse, die eine Einschätzung bezüglich der Krankheitsrelevanz dieser Mutationen ermöglichen.

Da die Mutation CACNA1H^{S475T} bisher in der Literatur kaum beschrieben ist, kann mit dieser Arbeit ein kleiner Beitrag geleistet werden. CACNA1H^{S475T} scheint auf die Funktion des Kanals nur einen kleinen Einfluss zu haben. Dementsprechend kann diese Mutante bei Erforschung des CACNA1H eher vernachlässigt werden. Da sich die Aminosäuren Serin und Threonin recht ähnlich sind, kamen die Ergebnisse nicht überraschend. Auch deshalb wurde der gekoppelte Effekt beider Mutationen CACNA1H^{S475T/R788C} untersucht.

Die Mutation CACNA1H^{R788C} ist bereits bei Epilepsiepatienten beschrieben. Ob die Mutation hingegen relevant für die Entstehung eines Hyperaldosteronismus ist, wurde zuvor noch nicht untersucht. Auch hier kann die Arbeit zwar einen kleinen, aber nicht signifikanten und dahingehend wahrscheinlich nicht krankheitsrelevanten Einfluss der Mutation aufzeigen.

Ein weiterer Teilaspekt dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob die Kombination beider Mutationen einen möglichen Effekt verstärken oder erst hervorbringen kann. In **Abbildung 14** kann eine Tendenz zu einer erhöhten Stromdichte bei CACNA1H^{S475T/R788C} im Vergleich zu CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} beobachtet werden. Diese ist aber, wie auch die anderen Ergebnisse, statistisch nicht signifikant. Ein eindeutiger Trend einer Effektverstärkung bei Kombination beider Mutationen lässt sich aus dieser Arbeit nicht ableiten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Arbeit dahingehend einen Beitrag geleistet hat, dass die untersuchten Mutationen als wahrscheinlich nicht ursächlich bzw. nicht allein verantwortlich für die Entstehung eines Hyperaldosteronismus eingeschätzt werden können.

6. Zusammenfassung

Das Ziel der medizinischen Doktorarbeit war es, herauszufinden, ob die bei der Patientin detektierten Mutationen CACNA1H^{S475T} und CACNA1H^{R788C} bzw. ihre Kombination CACNA1H^{S475T/R788C} ursächlich für einen Primären Hyperaldosteronismus sein können. Dafür wurden NCI Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche zum einen genau diese mutierten Gene trugen und zum anderen die Sequenz für den WT CACNA1H. An diesen Zellen wurden anschließend Whole-Cell Patch Clamp Experimente durchgeführt und neben Strom-Spannungskurven auch die Zeit der Aktivierung und Inaktivierung des CACNA1H gemessen. Die Gruppen wurden untereinander verglichen und die Ergebnisse hinsichtlich statistischer Unterschiede untersucht. Es konnten zwar Unterschiede, zwischen WT CACNA1H und den mutierten Kanälen gefunden werden, diese waren aber nicht statistisch signifikant.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass es unwahrscheinlich ist, dass die Mutationen CACNA1H^{S475T}, CACNA1H^{R788C} und CACNA1H^{S475T/R788C} allein für die Entstehung des Primären Hyperaldosteronismus verantwortlich sind, wenn sie vielleicht auch dazu beitragen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2 Darstellung der Nebennierenrinde mit Anschnitt des Marks aus: Sherlock, Mark; Scarsbrook, Andrew; Abbas, Afroze; Fraser, Sheila; Limumpornpetch, Padiporn; Dineen, Rosemary; Stewart, Paul M. (2020): Adrenal Incidentaloma. In: *Endocrine Review* 41 (6), S. 775–820. Online verfügbar unter <https://dx.doi.org/10.1210%2Fendrev%2Fbnaa008>.

Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Zona Glomerulosa Zelle aus: Bandulik, S.; Barhanin, Jacques; Warth, Richard (2019): Potassium channels in adrenocortical cells. In: *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* (8), S. 1–8. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/journal/current-opinion-in-endocrine-and-metabolic-research>, Abbildung modifiziert.

Abbildung 5 Strom – Spannung – Kurven von LVA und HVA Calcium – Kanälen aus: Cribbs, Leanne L.; Lee, Jung-Ha; Yang, Jie; Satin, Jonathan; Zhang, Yi; Daud, Asif et al. (1998): Cloning and Characterization of $\alpha 1H$ From Human Heart, a Member of the T-Type Ca_{v1} Channel Gene Family. In: *Circulation Research* 83 (1), S. 103–109. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.1.103>, Abbildung modifiziert.

Abbildung 6 Aufbau eines spannungsabhängigen Calcium – Kanals (Ca_v) aus: Dolphin, Annette C. (2012): Calcium channel auxiliary $\alpha 2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. In: *Nature Reviews Neuroscience* 13 (8), S. 542–555. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/nrn3311>, Abbildung modifiziert.

Abbildung 7 Inaktivierung von T-Typ und L-Typ Calcium – Kanälen Cribbs, Leanne L.; Lee, Jung-Ha; Yang, Jie; Satin, Jonathan; Zhang, Yi; Daud, Asif et al. (1998): Cloning and Characterization of $\alpha 1H$ From Human Heart, a Member of the T-Type Ca_{v1} Channel Gene Family. In: *Circulation Research* 83 (1), S. 103–109. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.1.103>, Abbildung modifiziert.

Abbildung 8 Veränderungen der Strom – Spannung – Kurve (A), der Aktivierung (B) und Inaktivierung (C) des CACNA1H bei Veränderungen des Gating Breaks aus Arias-Olguín, Imilla I.; Vitko, Iuliia; Fortuna, Michal; Baumgart, Joel P.; Sokolova,

Svetlana; Shumilin, Igor A. et al. (2008): Characterization of the Gating Brake in the I-II Loop of CaV3.2 T-type Ca²⁺ Channels. In: The Journal of Biological Chemistry 283 (13), S. 8136–8144. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1074/jbc.M708761200>, Abbildung modifiziert.

Abbildung 9 Vergleich der Strom-Spannungskurve von WT CACNA1H (schwarz) und CACNA1H^{M1549V} (grau) (A), sowie Darstellung der unterschiedlichen Kinetik mit Aktivierung (B) und Inaktivierung (C) von WT CACNA1H und CACNA1H^{M1549V}, gemessen an humanen NCI-H295R Zellen aus: Gürtler, F.; Jordan, K.; Tegtmeier, I.; Herold, J.; Stindl, J.; Warth, R.; Bandulik, S. (2020): Ca²⁺ Cellular pathophysiology of mutant voltage-dependent channel CACNA1H in primary aldosteronism. In: Endocrinology 161 (10). Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa135>, Abbildung modifiziert.

Abbildung 11 Effekte der Mutation R788C auf die Aktivierung (A) und Inaktivierung (B) des CACNA1H aus: Vitko, Iuliia; Chen, Yucai; Arias, Juan M.; Shen, Yen; Wu, Xi-Ru; Perez-Reyes, Edward (2005): Functional Characterization and Neuronal Modeling of the Effects of Childhood Absence Epilepsy Variants of CACNA1H, a T-Type Calcium Channel. In: The Journal of Neuroscience 25 (19), S. 4844–4855. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0847-05.2005>, Abbildung modifiziert.

Literaturverzeichnis

Arias-Olguín, Imilla I.; Vitko, Iuliia; Fortuna, Michal; Baumgart, Joel P.; Sokolova, Svetlana; Shumilin, Igor A. et al. (2008): Characterization of the Gating Brake in the I-II Loop of CaV3.2 T-type Ca²⁺ Channels. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (13), S. 8136–8144. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1074/jbc.M708761200>.

Bähring, Robert; Covarrubias, Manuel (2011): Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. In: *The Journal of Physiology* 589 (3), S. 461–479. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191965>.

Bassett, Mary H.; Suzuki, Takashi; Sasano, Hironobu; Vries, Carlie J. M. de; Jimenez, Patricia T.; Carr, Bruce R.; Rainey, William E. (2004): The Orphan Nuclear Receptors NURR1 and NGFIB Regulate Adrenal Aldosterone Production. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (36), S. 37622–37630. DOI: 10.1074/jbc.M405431200.

Catterall, William A. (2011): Voltage-Gated Calcium Channels. In: *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 3 (8). Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>.

Cribbs, Leanne L.; Lee, Jung-Ha; Yang, Jie; Satin, Jonathan; Zhang, Yi; Daud, Asif et al. (1998): Cloning and Characterization of a1H From Human Heart, a Member of the T-Type Ca²⁺ Channel Gene Family. In: *Circulation Research* 83 (1), S. 103–109. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1161/01.RES.83.1.103>.

Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL: Was ist Bluthochdruck. Sekundäre Hypertonie. Online verfügbar unter <https://www.hochdruckliga.de/betroffene/bluthochdruck>.

Dolphin, Annette C. (2012): Calcium channel auxiliary $\alpha 2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. In: *Nature Reviews Neuroscience* 13 (8), S. 542–555. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/nrn3311>.

- Guagliardo, Nick A.; Junlan, Yao; Hu, Changlong; Barrett, Paula Q. (2012): Minireview: Aldosterone Biosynthesis: Electrically Gated for Our Protection. In: *Endocrinology* 153 (8), S. 3579–3586. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1210/en.2012-1339>.
- Gürtler, F.; Jordan, K.; Tegtmeier, I.; Herold, J.; Stindl, J.; Warth, R.; Bandulik, S. (2020): Ca²⁺ Cellular pathophysiology of mutant voltage-dependent channel CACNA1H in primary aldosteronism. In: *Endocrinology* 161 (10). Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa135>.
- Hu, Changlong; Rusin, Craig G.; Tan, Zhiyong; Guagliardo, Nick A.; Barrett, Paula Q. (2012): Zona glomerulosa cells of the mouse adrenal cortex are intrinsic electrical oscillators. In: *The Journal of Clinical Investigation* 122 (6), S. 2046–2053. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1172/JCI61996>.
- Karmažínová, M.; Lacinová, L. (2010): Measurement of Cellular Excitability by Whole Cell Patch Clamp Technique. In: *Physiological Research* (59), S. 1–7. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.33549/physiolres.932000>.
- McCarthy, Richard, T.; Isales, Carlos; Rasmussen, Howard (1993): T-type calcium channels in adrenal glomerulosa cells: GTP-dependent modulation by angiotensin II. In: *PNAS* (90), 3260-3264,. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3260>.
- Nowycky, M.; Fox, A.; Tsien, R. (1985): Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. In: *Nature* (316), S. 440–443. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/316440a0>.
- Quinkler, M.; Reincke, M. (2006): Moderne pharmakologische Aspekte der Therapie des Aldosteronismus. In: *Internist* 47 (953 – 959). Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/s00108-006-1681-0>, zuletzt geprüft am 06.10.2021.
- Reimer, Esther N.; Walenda, Gudrun; Seidel, Eric; Scholl, Ute I. (2016): CACNA1HM1549V Mutant Calcium Channel Causes Autonomous Aldosterone Production in HAC15 Cells and Is Inhibited by Mibefradil. In: *Endocrinology* (157), S. 3016–3022. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1210/en.2016-1170>.
- Robert Koch Institut: Hypertonie. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Hypertonie/Hypertonie_node.html.

Rossier, Michel F. (2016): T-Type Calcium Channel: A Privileged Gate for Calcium entry and Control of Adrenal Steroidogenesis. In: *Frontiers in Endocrinology* 7. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00043>.

Rossier, Michel F.; Aptel, Hervé B. C.; Python, Christophe P.; Burnay, Muriel M.; Vallotton, Michel B.; Capponi, Alessandro M. (1995): Inhibition of Low Threshold Calcium Channels by Angiotensin II in Adrenal Glomerulosa Cells through Activation of Protein Kinase C*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270 (25), S. 15137–15142. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15137>.

Scholl, Ute I.; Stölting, Gabriel; Nelson-Williams, Carol; Vichot, Alfred A.; Choi, Murim; Loring, Erin et al. (2015): Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. In: *eLife* 2015;4:e06315. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.7554/eLife.06315>.

Vitko, Iuliia; Chen, Yucui; Arias, Juan M.; Shen, Yen; Wu, Xi-Ru; Perez-Reyes, Edward (2005): Functional Characterization and Neuronal Modeling of the Effects of Childhood Absence Epilepsy Variants of CACNA1H, a T-Type Calcium Channel. In: *The Journal of Neuroscience* 25 (19), S. 4844–4855. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0847-05.2005>.

Wilke, Bettina U.; Lindner, Moritz; Greifenberg, Lea; Albus, Alexandra; Kronimus, Yannick; Bünemann, Moritz et al. (2014): Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. In: *Nature communications* 5, S. 5540. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/ncomms6540>.

Williams, Bryan; Mancia, Giuseppe; Spiering, Wilko; Rosei, Enrico Agabiti; Azizi, Michel; Burnier, Michel et al. (2018): 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). In: *European Heart Journal* 36 (10), 1953–2041. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001940>, zuletzt geprüft am 06.10.2021.

Erklärung

PD Dr. rer. nat. Sascha Bandulik hat diese Dissertation angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)